

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE VETERINARIA**  
**Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de**  
**los Alimentos**



**IDENTIFICACIÓN DE CARNES Y PRODUCTOS**  
**CARNICOS PROCEDENTES DE AVES DE CAZA Y DE**  
**LA AVICULTURA ALTERNATIVA MEDIANTE**  
**TECNICAS GENÉTICAS PCRS**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR**  
**PRESENTADA POR**

**María Rojas Diéguez**

Bajo la dirección de las doctoras  
M<sup>a</sup> del Rosario Martín de Santos  
Teresa García Lacarra  
M<sup>a</sup> Isabel González Alonso

**Madrid, 2012**

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE VETERINARIA**

**DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN, BROMATOLOGÍA Y  
TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS**



**IDENTIFICACIÓN DE CARNES Y PRODUCTOS  
CÁRNICOS PROCEDENTES DE AVES DE CAZA Y DE  
LA AVICULTURA ALTERNATIVA MEDIANTE  
TÉCNICAS GENÉTICAS DE PCR**

**TESIS DOCTORAL**

**MARÍA ROJAS DIÉGUEZ**

**Madrid, 2011**





**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE VETERINARIA**

**DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN, BROMATOLOGÍA Y  
TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS**



**IDENTIFICACIÓN DE CARNES Y PRODUCTOS CÁRNICOS  
PROCEDENTES DE AVES DE CAZA Y DE LA AVICULTURA  
ALTERNATIVA MEDIANTE TÉCNICAS GENÉTICAS DE PCR**

**TESIS DOCTORAL**

**MARÍA ROJAS DIÉGUEZ**

**Madrid, 2011**



**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE VETERINARIA**

**DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN, BROMATOLOGÍA Y  
TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS**



**IDENTIFICACIÓN DE CARNES Y PRODUCTOS CÁRNICOS  
PROCEDENTES DE AVES DE CAZA Y DE LA AVICULTURA  
ALTERNATIVA MEDIANTE TÉCNICAS GENÉTICAS DE PCR**

Memoria que, para optar al título de Doctor con mención honorífica de “Doctorado Europeo”, presenta la Licenciada

María Rojas Diéguez







DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN, BROMATOLOGÍA Y  
TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS  
FACULTAD DE VETERINARIA

Ciudad Universitaria , s/n. 28040 Madrid

Teléfono: 91 394 37 50. Fax: 91 394 37 43

**M<sup>a</sup> DEL ROSARIO MARTÍN DE SANTOS** (*Catedrática de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos*), **TERESA GARCÍA LACARRA** (*Profesora Titular de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos*) y **M<sup>a</sup> ISABEL GONZÁLEZ ALONSO** (*Profesora Titular de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos*),

CERTIFICAN:

Que la Tesis Doctoral titulada “Identificación de carnes y productos cárnicos procedentes de aves de caza y de la avicultura alternativa mediante técnicas genéticas de PCR”, de la que es autora la Licenciada en Veterinaria Dña. María Rojas Diéguez, ha sido realizada en el Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid, bajo la dirección conjunta de las que suscriben, y cumple las condiciones exigidas para optar al título de Doctor con mención honorífica de “Doctorado Europeo”.

Madrid, 6 de octubre de 2011

Fdo: M<sup>a</sup> Rosario Martín de Santos

Fdo: Teresa García Lacarra

Fdo: M<sup>a</sup> Isabel González Alonso



*A mis padres y hermanas*

*A mi sobrina*

*A Kike*

*En memoria de mis abuelas*



## **AGRADECIMIENTOS**

*Me gustaría mostrar mi más sincero agradecimiento a todas las personas que han contribuido directa o indirectamente a la realización de esta tesis. A pesar de que soy una persona más de hechos que de palabras, espero ser capaz de expresar en estas líneas la inmensa gratitud que siento hacia todos vosotros.*

*En primer lugar quisiera dar las gracias a mis directoras de tesis, Rosario Martín de Santos, Teresa García Lacarra e Isabel González Alonso. Charo, no tengo palabras para mostrarte mi agradecimiento por todo el apoyo y la confianza depositada en mí durante estos años. Tus charlas y consejos me han ayudado no sólo a orientarme en el complejo mundo de la investigación científica, sino que también han enriquecido mi vida a nivel personal. Teresa, gracias por haber confiado en mí desde el primer momento, y por la ayuda y consejos proporcionados durante la elaboración de esta tesis. Isabel, te muestro mi gratitud por tu permanente y atento apoyo, y por estar siempre dispuesta a echarme una mano y contestar mis dudas.*

*Al Ministerio de Educación y Ciencia por la asignación del Proyecto AGL 2007-60077 y a la Comunidad Autónoma de Madrid por la concesión de los Programas de Vigilancia Sanitaria S-0505/AGR/000265 y 2009/AGR/1489. Asimismo, agradecer al Ministerio de Educación y Ciencia por la beca recibida dentro del Plan de Formación de Profesorado Universitario.*

*A Lorenzo de la Hoz Perales (†), Director del Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid cuando empecé mi tesis doctoral, por darme la oportunidad de realizarla en este Departamento, y a la actual Directora, M<sup>a</sup> Dolores Selgas Cortecero, por su ayuda en la tramitación de esta tesis.*

*Mi más sincero agradecimiento a todos los profesores y personal del Departamento por su acogida y generosidad, especialmente a Pablo y Juan Miguel, por su cercanía y por las agradables charlas compartidas por los pasillos. Gracias también a Aurora y Alberto, por la ayuda prestada durante todos estos años. Y por supuesto a Santiago y Rosi, por alegrarme cada mañana con sus bromas y animadas conversaciones.*

*Al Departamento de Biología Animal y Genética de la Universidad de Florencia en Italia, por permitirme disfrutar de una maravillosa estancia de tres meses en su centro. En especial a Mariella Baratti y Francesco Dessì por su acogida y enseñanzas en el laboratorio. Y a Claudia y Francesca, por su simpatía, su ayuda con el idioma, y por ayudarme a descubrir el “aperitivo” y los rincones más pintorescos y hermosos de esa fascinante ciudad llamada Florencia.*

*Por supuesto, un apartado especial en estos agradecimientos está reservado para mis compañeros de laboratorio, excelentes amigos con quienes he vivido infinidad de momentos inolvidables. Sin vuestra simpatía y generosidad jamás habría terminado esta tesis. Agradecer en primer lugar a Miguel, mi compañero del alma. Me siento muy afortunada de haber podido*



*compartir mi doctorado con una persona tan especial como tú. Supongo que ya lo sabes, pero tenerte a mi lado en el laboratorio ha sido indispensable para que esta tesis llegase a buen puerto. Gracias por tu complicidad y ánimos constantes, y por las risas y carcajadas que me has regalado a lo largo de estos años. Espero poder seguir disfrutando de tus bromas y tus cánticos ochenteros durante mucho tiempo. A Nicolette, mi canariona favorita, con la que he compartido miles de risas, llantos y confidencias. Gracias por tu comprensión y apoyo, y por hacerme reír cada día con tus peculiares historias. Aunque sólo he podido disfrutar de tu compañía durante la mitad de esta aventura, sé que he ganado una buena amiga. A Violeta y Almudena, excelentes compañeras durante el tiempo que estuvimos juntas en el laboratorio, y ahora grandes amigas. Violeta, gracias por tu apoyo incondicional desde el primer día que llegué al laboratorio. Siempre me has prestado tu ayuda cuando la he necesitado y me has escuchado y apoyado en los momentos difíciles. Almudena, muchas gracias por tu apoyo y palabras de ánimo. Me hace muy feliz poder compartir mi vida con personas tan transparentes y bondadosas como tú. Estoy segura de que saldrás victoriosa de la nueva etapa en la que te has embarcado. Gracias de corazón a los cuatro. Sois el mejor regalo que me llevo de estos años...*

*A Irene, mi “profe de PCR”, que me ha demostrado que la paciencia y el esfuerzo al final dan sus frutos. Gracias por tu compañía, apoyo y ánimos durante el tiempo que hemos compartido dentro y fuera del laboratorio. A Eugenia, por su simpatía y sus largas charlas filosóficas. Gracias a tí he aprendido que nada ni nadie debe impedirme conseguir hacer realidad tus sueños. Seguro que dentro de poco tiempo serás tú la que esté escribiendo estas líneas de agradecimientos.*

*Al grupo de “punto lab”: Juan, Loreto, Juanjo, Cristina y Estefanía, por su generosidad y gran compañerismo. Echaré de menos nuestras charlas por los pasillos y las amenas conversaciones durante las comidas en la cafetería. Y a las “chicas de Juan Miguel”, en especial a Esther, Rebeca, Marta y Virginia, por su amabilidad y simpatía. Ha sido un privilegio poder compartir estos años de laboratorio con unos “vecinos” como vosotros.*

*A las nuevas incorporaciones, Silvia, Carlos, Sara, Marta y Alicia por su alegría y entusiasmo, y por ofrecerme siempre una sonrisa y palabra amables en mis últimas visitas al laboratorio. Y a Inés, con la que he podido compartir el inicio y el final de esta aventura, por su amabilidad y comprensión.*

*Quisiera agradecer también a los antiguos compañeros, Belén, Nuria, Antonio B., Jorge, María y Bea, por todos los buenos momentos vividos. Y en general a todas las personas que de un modo u otro han contribuido con su presencia al buen ambiente en el laboratorio: Daniela, Luis (†), Nivia, Pepe, Antonio M., Susana, Arantxa, Ruth, Patricia, Irene...*

*A mis amigas, Gema, Patri, Belén, Bea y Sandra, por ayudarme a desconectar del mundo laboral, y por aguantar mis quejas y mi negatividad. Me gustaría agradecer especialmente a Nieves y Ani, por su profunda amistad y cariño. Siempre habéis estado a mi*

*lado, escuchando mis problemas y soportando mis llantos. No tengo palabras para expresar lo afortunada que me siento de tenerlos a mi lado.*

*A mis padres, que siempre están ahí, y sin cuyo apoyo nada de esto hubiera sido posible. Mamá, espero que no tengas que volver a aguantar mis lloros telefónicos y ataques de nervios... ¡por fin terminé! A mis hermanas y mi cuñado, por escucharme y soportarme durante todos estos años. Por supuesto agradecer a mi sobrina Elena, la niña de mis ojos, por ser la única capaz de arrancarme una sonrisa en los momentos difíciles y de hacerme olvidar mis preocupaciones. A mis abuelas, que se marcharon durante los años en los que realizaba esta tesis. Espero que estéis donde estéis os sintáis orgullosas de vuestra futura nieta doctora. Agradecer también a la familia de Kike, en especial a sus padres y hermanos, por su comprensión y apoyo, y a sus primos por las risas y los magníficos ratos que hemos compartido.*

*Por último, mi mayor muestra de gratitud está dirigida a la persona más importante de mi vida. Mi amigo del alma, mi compañero, mi soporte, mi paño de lágrimas. Gracias Kike por cuidarme, aconsejarme y por tener fe en mí, muchas veces más que yo misma. Tu paciencia, cariño y comprensión han sido esenciales para que esta etapa de mi vida llegue a su fin. La mitad de esta tesis es tuya...*

*Y finalmente gracias a todos los que he olvidado citar y que en mayor o menor medida han participado en la realización de esta tesis doctoral. Espero que sepáis perdonarme...*

**¡¡MUCHAS GRACIAS!!**



# *Índice*

---







<b>RESUMEN .....</b>	<b>1</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>11</b>
<b>I. EXPOSICIÓN GENERAL DEL PROBLEMA A INVESTIGAR.....</b>	<b>19</b>
<b>II. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>25</b>
II.1. ESPECIES DE AVES DE CAZA Y DE LA AVICULTURA ALTERNATIVA.....	27
II.2. CARNE Y PRODUCTOS CÁRNICOS PROCEDENTES DE AVES DE CAZA Y DE LA AVICULTURA ALTERNATIVA .....	41
II.3. PRODUCCIÓN Y COMERCIALIZACIÓN DE AVES DE CAZA Y DE LA AVICULTURA ALTERNATIVA.....	44
II.4. TÉCNICAS APLICADAS A LA IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES DE AVES DE CAZA Y DE LA AVICULTURA ALTERNATIVA EN CARNE Y PRODUCTOS CÁRNICOS .....	56
II.4.1. TÉCNICAS BASADAS EN EL ANÁLISIS DE PROTEÍNAS .....	56
II.4.1.1. Técnicas electroforéticas .....	56
II.4.1.2. Técnicas cromatográficas: cromatografía líquida de alta resolución: (HPLC).....	58
II.4.1.3. Técnicas espectrométricas .....	59
II.4.1.4. Técnicas inmunológicas.....	60
II.4.2. TÉCNICAS GENÉTICAS.....	62
II.4.2.1. Secuenciación de los fragmentos de ADN amplificados por PCR (PCR-secuenciación). .....	62
II.4.2.2. Análisis del polimorfismo del ADN amplificado con cebadores arbitrarios (RAPD) .....	65
II.4.2.3. Estudio de secuencias repetitivas del ADN nuclear.....	67
II.4.2.4. Análisis del polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción de regiones amplificadas por PCR (PCR-RFLP) .....	68
II.4.2.5. PCR con cebadores específicos .....	70
II.4.2.6. PCR en tiempo real.....	71
II.4.2.7. Microarrays de ADN.....	73
<b>III. RESULTS AND DISCUSSION (Published articles).....</b>	<b>75</b>
III.1. IDENTIFICATION OF MEAT AND MEAT PRODUCTS FROM GAME AND ALTERNATIVE POULTRY FARMING AVIAN SPECIES BY GENETIC TECHNIQUES.....	77

III.1.1. PCR-RFLP TECHNIQUES .....	77
III.1.2. PCR USING SPECIES-SPECIFIC PRIMERS .....	99
III.1.3. REAL-TIME PCR .....	141
<b>IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>185</b>
IV.1. IDENTIFICACIÓN DE CARNES Y PRODUCTOS CÁRNICOS PROCEDENTES DE ESPECIES DE AVES DE CAZA Y DE LA AVICULTURA ALTERNATIVA POR TÉCNICAS GENÉTICAS.....	187
IV.1.1. TÉCNICA DE PCR-RFLP .....	188
IV.1.2. TÉCNICA DE PCR CON CEBADORES ESPECÍFICOS.....	196
IV.1.3. TÉCNICA DE PCR EN TIEMPO REAL.....	208
<b>V. CONCLUSIONES.....</b>	<b>223</b>
<b>V. CONCLUSIONS .....</b>	<b>227</b>
<b>VI. TRABAJO FUTURO.....</b>	<b>229</b>
<b>VII. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>241</b>
<b>VIII. GLOSARIO DE ABREVIATURAS .....</b>	<b>267</b>

***“El trabajo que nunca se empieza  
es el que tarda más en finalizarse”***

John Ronald Reuel Tolkien



# *Resumen* *Abstract*

---







El consumo de carne procedente de las aves de caza ha aumentado de forma notable en los últimos años. Asimismo, cada vez son más numerosas las explotaciones dedicadas a la producción intensiva de aves de caza y de otras especies no cinegéticas, en lo que se conoce como avicultura alternativa. Sin embargo, dado que estas especies alcanzan precios elevados en el mercado, es frecuente que se sustituyan de forma fraudulenta por otras de menor valor comercial y organoléptico (Wolf y col., 1999). Este hecho justifica la necesidad de desarrollar técnicas analíticas rápidas que permitan llevar a cabo la adecuada identificación de estas aves, tanto en carnes y productos cárnicos frescos, como en productos transformados (escabechados, estofados, deshuesados, patés, etc.). En la actualidad, las técnicas genéticas basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) constituyen una de las alternativas más empleadas para llevar a cabo la diferenciación de especies animales en los alimentos debido a su sensibilidad, rapidez y especificidad (Lenstra y col., 2001). Además, la técnica de PCR permite el análisis de muestras sometidas a distintos tratamientos tecnológicos, incluida la esterilización.

Teniendo en cuenta estos aspectos, en esta tesis doctoral se han utilizado distintas técnicas genéticas de PCR (análisis del polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción de regiones amplificadas por PCR (PCR-RFLP), PCR con cebadores específicos y PCR en tiempo real) para la detección e identificación de carnes procedentes de las siguientes especies de aves de caza y de la avicultura

alternativa: codorniz (*Coturnix coturnix*), faisán (*Phasianus colchicus*), pintada (*Numida meleagris*), perdiz roja (*Alectoris rufa*), perdiz chukar (*Alectoris chukar*), perdiz moruna (*Alectoris barbara*), perdiz pardilla (*Perdix perdix*), paloma bravía (*Columba livia*), paloma torcaz (*Columba palumbus*), paloma zurita (*Columba oenas*), becada (*Scolopax rusticola*), zorzal común (*Turdus philomelos*), avestruz (*Struthio camelus*) y urogallo (*Tetrao urogallus*). Asimismo, se aborda su diferenciación de carnes de especies domésticas de consumo habitual como el pollo (*Gallus gallus*), pavo (*Meleagris gallopavo*), pato de berbería (*Cairina moschata*) y oca (*Anser anser*).

### **1. Desarrollo de técnicas de PCR-RFLP para la identificación de carnes y productos cárnicos procedentes de aves de caza y de la avicultura alternativa**

La identificación de especies animales mediante técnicas genéticas exige una cuidadosa selección de los marcadores a utilizar. Para el desarrollo de técnicas de PCR-RFLP se eligieron como marcadores genéticos el gen mitocondrial que codifica la subunidad 12S del ARN ribosómico (gen 12S ARNr) y la región polimórfica D-loop incluida en la región control del ADN mitocondrial, ya que presentan una longitud y tasa de mutación adecuadas para discriminar especies estrechamente relacionadas. En el caso de la técnica desarrollada en el gen 12S ARNr, se seleccionaron los cebadores conservados 12S-Fw/12S-Rev, diseñados por Fajardo y col. (2006) a partir de secuencias del gen 12S ARNr de varias especies de aves y mamíferos. Con relación

al ensayo basado en la región mitocondrial D-loop, el estudio informático de las secuencias de este marcador disponibles en las bases de datos para diferentes especies animales permitió el diseño de los cebadores conservados DloopShort-Fw/DloopShort-Rev. Estas parejas de cebadores amplificaron fragmentos comunes de aproximadamente 720 y 310 pares de bases (pb) en los genes 12S ARNr y D-loop, respectivamente, a partir del ADN de codorniz, faisán, perdiz roja, perdiz chukar, pintada, urogallo, becada, paloma torcaz, paloma bravía, zorzal común y avestruz, así como en otras especies de aves de consumo habitual (pollo, pavo, pato de berbería y oca). En el avestruz, sólo se amplificó el fragmento de 720 pb del gen 12S ARNr. La información contenida en las secuencias nucleotídicas amplificadas, facilitó la elaboración de los mapas de restricción de todas las especies elegidas y la posterior selección de las enzimas más adecuadas para llevar a cabo su diferenciación por PCR-RFLP. La combinación de las enzimas *AluI* y *BfaI*, permitió la identificación de las especies analizadas en el caso de la técnica de PCR-RFLP basada en el gen 12S ARNr. Por otra parte, la utilización combinada de las endonucleasas *HinfI*, *MboII* y *Hpy188III* hizo posible la diferenciación de las especies analizadas en el caso de la técnica desarrollada en el gen D-loop.

La técnica de PCR-RFLP basada en el gen D-loop permitió llevar a cabo la identificación de las especies diana tanto en muestras de carne cruda, como en carne tratada térmicamente (121 °C durante 20 min), así como en diversos productos

comerciales (escabeches, estofados, etc.) que contenían carne de las especies diana. Sin embargo, la técnica de PCR-RFLP basada en el gen 12S ARNr sólo resultó adecuada para la identificación de especies en carnes y productos cárnicos crudos, no siendo aplicable en productos tratados térmicamente puesto que el tratamiento térmico degrada el ADN impidiendo la amplificación del fragmento conservado de 720 pb.

## **2. Desarrollo de técnicas de PCR con cebadores especie-específicos para la identificación de carnes y productos cárnicos procedentes de aves de caza y de la avicultura alternativa**

La alineación y análisis informático de las secuencias nucleotídicas del fragmento amplificado con los cebadores 12S-Fw/12S-Rev en las especies objeto de estudio, permitió el diseño de parejas de cebadores para la amplificación de fragmentos específicos de codorniz (129 pb), faisán (113 pb), perdices del género *Alectoris* (perdiz roja, perdiz chukar y perdiz moruna) (141 pb), perdiz roja (112 pb), perdiz pardilla (123 pb), pintada (139 pb), paloma (133 pb), becada (138 pb), zorzal común (110 pb), urogallo (142 pb) y avestruz (155 pb), en el gen mitocondrial 12S ARNr. Esta amplificación se produjo tanto en muestras de carne cruda, como en aquellas sometidas a tratamientos térmicos de pasteurización (72 °C durante 30 min) y esterilización (121 °C durante 20 min). Todas las parejas de cebadores demostraron ser específicas frente a la especie diana correspondiente, no originando bandas de amplificación a partir

del ADN de otras especies de aves y mamíferos de caza y domésticos.

Paralelamente, la información contenida en las secuencias nucleotídicas de la región mitocondrial D-loop amplificada con los cebadores DloopShort-Fw/DloopShort-Rev hizo posible el diseño de cebadores para la amplificación de fragmentos de ADN específicos de paloma (147 pb), becada (127 pb) y zorzal común (154 pb). Sin embargo, debido al alto grado de similitud entre las secuencias del gen D-loop amplificadas con los cebadores DloopShort-Fw/DloopShort-Rev, no fue posible diseñar parejas de cebadores específicos para el resto de especies. Por este motivo, se llevó a cabo la amplificación y secuenciación de un fragmento de mayor tamaño en la región mitocondrial D-loop empleando la pareja de cebadores conservados DloopLong-Fw y DloopLong-Rev. Estos cebadores se diseñaron a partir de secuencias disponibles en las bases de datos y permitieron la amplificación de un fragmento conservado de la región D-loop de entre 485 y 600 pb, dependiendo de la especie. El análisis de las secuencias generadas permitió el diseño de cebadores para la amplificación de fragmentos específicos de 96, 100, 104, 106 y 97 pb a partir del ADN de codorniz, faisán, perdices del género *Alectoris*, pintada y urogallo, respectivamente. Por otra parte, el estudio de las secuencias del gen D-loop disponibles en las bases de datos para el avestruz, permitió el diseño de una pareja de cebadores para la amplificación de un fragmento específico de 148 pb a partir del ADN de esta especie. De forma similar a los cebadores diseñados en el gen mitocondrial 12S ARNr, las parejas de

cebadores específicos basadas en la región D-loop permitieron la amplificación de las especies diana tanto en muestras crudas como en muestras pasteurizadas y esterilizadas. Asimismo, todos los cebadores demostraron ser específicos para la especie diana ya que no originaron bandas de amplificación en otras especies de aves y mamíferos de caza y domésticos.

En las técnicas de PCR, la presencia de sustancias inhibitoras en las muestras a analizar puede disminuir o incluso impedir por completo la amplificación del ADN. Para evitar una incorrecta interpretación de aquellos resultados de amplificación negativa que puedan deberse a fenómenos de inhibición, se diseñaron las parejas de cebadores conservados 18SEu-Fw/18SEu-Rev y 18SpEu-Dir/18SpEu-Inv a partir de secuencias del gen nuclear 18S disponibles en las bases de datos para varias especies de aves y mamíferos. Estos cebadores amplificaron fragmentos de 89 y 141 pb, respectivamente, en todas las especies analizadas.

El límite de detección de los cebadores específicos se determinó mediante la amplificación por PCR del ADN obtenido a partir de mezclas binarias experimentales que contenían un 0,1, 1, 5, 10, 25 y 50 % de tejido muscular de la especie diana en tejido muscular de pollo. Las mezclas binarias se analizaron crudas y tras someterse a un tratamiento térmico de esterilización. El límite de detección fue del 0,1 % para todas las especies analizadas, no modificándose cuando se analizaron las mezclas esterilizadas.

Posteriormente, las parejas de cebadores especie-específicos se emplearon para llevar a cabo el análisis de diversos productos comerciales (escabeches, patés, estofados, embutidos, etc.) que contenían carne de las especies diana. Los cebadores específicos diseñados permitieron la identificación de las especies diana en todos los productos analizados a excepción de varios patés de perdiz en los que no se produjo amplificación con los correspondientes cebadores específicos. Sin embargo sí se obtuvo amplificación con las dos parejas de cebadores empleadas como control positivo, lo cual puede indicar la existencia de un posible fraude en el etiquetado de estos productos. Asimismo, diversas conservas etiquetadas como carne de perdiz roja no se amplificaron con los cebadores específicos de perdiz roja, aunque sí se obtuvo amplificación con los cebadores específicos para especies de perdiz del género *Alectoris*, así como con los cebadores empleados como control positivo de amplificación. Estos resultados podrían deberse a un posible fraude derivado de la sustitución de perdiz roja por otras perdices del género *Alectoris*.

Las técnicas desarrolladas se utilizaron también para llevar a cabo el análisis de piensos destinados a la alimentación de animales de compañía que contenían carne de las especies diana. Los cebadores específicos diseñados permitieron la identificación de las especies diana en la mayoría de los piensos analizados. No obstante, en algunos piensos elaborados con carne de faisán no se obtuvo amplificación con los cebadores específicos de faisán, lo cual podría indicar un fraude en su etiquetado.

Por otra parte, en esta tesis doctoral se desarrolló un método para la detección de fraudes en el etiquetado de productos cárnicos procedentes de perdiz roja. La carne de perdiz roja despierta un especial interés entre los consumidores alcanzando precios elevados en el mercado en comparación con otras especies de perdiz. Los productos comerciales de perdiz roja presentan en su etiquetado dos tipos de denominaciones: “carne de perdiz roja” y “carne de perdiz roja de caza”. Conviene especificar que en la elaboración de los primeros se pueden emplear ejemplares de perdiz roja puros, o híbridos resultantes de cruces industriales de perdiz roja con perdiz chukar. Por el contrario, sólo ejemplares puros de perdiz roja pueden ser etiquetados como perdiz roja de caza. Teniendo en cuenta que el ADN mitocondrial es heredado únicamente por vía materna, el empleo de los cebadores específicos de perdiz roja diseñados en el gen 12S ARNr presenta limitaciones para el análisis de autenticidad de los productos cárnicos de perdiz roja puesto que no permiten la detección de aquellos individuos etiquetados como “carne de perdiz roja” resultantes de cruces entre hembras de perdiz chukar y machos de perdiz roja, y tampoco permiten determinar si las perdices rojas empleadas en la elaboración de los productos etiquetados como “carne de perdiz roja de caza” corresponden a individuos puros o a híbridos resultantes de cruces entre hembras de perdiz roja y machos de perdiz chukar.

Debido a la imposibilidad de diferenciar perdices rojas puras e híbridas mediante el empleo de los cebadores específicos de

perdiz roja diseñados en el gen mitocondrial 12S ARNr, se seleccionó como marcador genético el gen nuclear que codifica para la rodopsina. Este gen se emplea para la diferenciación de perdices rojas puras, híbridos de perdiz chukar y roja, y perdices chukar puras en un estudio desarrollado por Arruga y col. (2007a). El método descrito por estos investigadores se basa en la amplificación de un fragmento de 441 pb del intron 1 del gen que codifica para la rodopsina y en la posterior detección en este fragmento de un polimorfismo en una base nucleotídica distinta en perdiz roja y en perdiz chukar. Sin embargo, teniendo en cuenta que la amplificación de fragmentos mayores a 200 pb puede resultar problemática en muestras tratadas térmicamente, en este trabajo se llevó a cabo el diseño de una nueva pareja de cebadores que permitiese la amplificación en muestras de perdiz tratadas térmicamente. El alineamiento y comparación de las secuencias del gen de la rodopsina disponibles en las bases de datos para perdiz roja y perdiz chukar permitió el diseño de una pareja de cebadores para la amplificación de un fragmento de 110 pb en ambas especies. La secuenciación de los fragmentos amplificados reveló la presencia del nucleótido timina en la posición 47 de la secuencia de las perdices rojas puras y del nucleótido citosina en las perdices chukar puras. Los híbridos resultantes de cruces entre perdiz roja y perdiz chukar presentaron ambas bases nucleotídicas en la misma posición.

Posteriormente, la técnica desarrollada se utilizó para el análisis de diversos productos comerciales de perdiz etiquetados

como “carne de perdiz roja” y “carne de perdiz roja de caza”. Los resultados de este análisis revelaron la existencia de fraudes de sustitución de perdiz roja por perdiz chukar pura en varios productos etiquetados como perdiz roja.

### ***3. Desarrollo de técnicas de PCR en tiempo real para la identificación de carnes y productos cárnicos procedentes de aves de caza y de la avicultura alternativa***

En los últimos años, los ensayos de PCR han evolucionado hacia procedimientos más rápidos y automatizados entre los que destaca la técnica de PCR en tiempo real. Esta técnica se basa en el empleo de compuestos fluorescentes y proporciona un resultado numérico en tiempo real que permite la cuantificación de la especie de interés y el tratamiento estadístico de los datos obtenidos.

En esta tesis doctoral se han desarrollado ensayos de PCR en tiempo real utilizando el agente intercalador fluorescente SYBR® Green y sondas TaqMan® especie-específicas para la identificación de carnes de codorniz, faisán, perdices del género *Alectoris*, pintada, becada, zorzal común, paloma bravía, paloma torcaz, paloma zurita, avestruz y urogallo. Para cumplir este objetivo, se utilizaron las parejas de cebadores diseñadas en el gen 12S ARNr para la amplificación de fragmentos de ADN específicos de codorniz, faisán, perdices del género *Alectoris*, pintada, paloma, becada, zorzal común, urogallo y avestruz, respectivamente. Para la detección de carne de paloma bravía, paloma torcaz y paloma

zurita se diseñaron en el gen mitocondrial 12S ARNr cebadores que permitían la amplificación de fragmentos específicos de 174, 128 y 121 pb, respectivamente. Además, se llevó a cabo el diseño de una pareja de cebadores para la amplificación de un fragmento conservado de 148 pb en las tres especies de paloma analizadas, puesto que la pareja de cebadores diseñados previamente para el análisis de carnes de paloma mediante PCR convencional sólo permitía la amplificación de paloma bravía y torcaz.

Por otra parte, se diseñaron sondas TaqMan<sup>®</sup> especie-específicas para la detección de codorniz, faisán, bécada, zorzal común, avestruz, urogallo, paloma bravía, torcaz y zurita. Asimismo, se diseñó una sonda para la detección conjunta de las tres especies de paloma. La similitud en la posición de los cebadores específicos de perdiz y pintada, y de los cebadores para la detección conjunta de paloma bravía y torcaz, permitió el diseño de una sonda común para estas especies. Como control positivo de amplificación y para normalizar los valores obtenidos en la detección específica de las especies diana se empleó la pareja de cebadores conservados 18SpEu-Dir/18SpEu-Inv y la sonda TaqMan<sup>®</sup> 18STM.

Todos los sistemas específicos permitieron la amplificación del fragmento específico esperado a partir del ADN de las correspondientes especies diana. El análisis de ADNs procedentes de diversas especies de aves y mamíferos, confirmó la especificidad de los sistemas en tiempo real desarrollados.

Asimismo, se procedió a la cuantificación de la presencia de ADN de las especies diana en mezclas cárnicas binarias crudas y esterilizadas, que contenían distintos porcentajes (0,1, 1, 5, 10, 25 y 50 %) de la especie diana en una matriz cárnica de pollo. Para ello, se utilizó el método de la cuantificación absoluta con relación a una recta estándar obtenida a partir de los valores de  $C_p$  de las mezclas cárnicas. Los resultados obtenidos demostraron la capacidad de las técnicas de PCR en tiempo real desarrolladas para llevar a cabo la detección cuantitativa de ADN de las especies diana en las mezclas cárnicas. No obstante, los resultados indicaron que el tipo de procesamiento térmico y el tejido animal presente en la muestra influyen en las ecuaciones de cuantificación.

El empleo de las sondas TaqMan<sup>®</sup> en la técnica de PCR en tiempo real desarrollada aportó ventajas frente al SYBR<sup>®</sup> Green, ya que mejoró la especificidad, eficiencia y sensibilidad alcanzadas. El límite de detección de ambos ensayos fue del 0,1 % para todas las especies analizadas, tanto en las muestras crudas como en las sometidas a tratamiento térmico.

Finalmente, la técnica de PCR en tiempo real con sondas TaqMan<sup>®</sup> se empleó para el análisis de diversos productos comerciales que contenían carne de las especies diana. La técnica de PCR permitió la detección de la especie diana en todos los productos analizados, a excepción de varios patés de perdiz y de faisán en los que no se obtuvo amplificación con los cebadores específicos correspondientes. Sin embargo,

el ADN procedente de estos patés sí se amplificó con los cebadores empleados como control positivo de amplificación. Estos resultados coinciden con los obtenidos en el análisis de los mismos productos mediante PCR convencional. Asimismo, varias conservas etiquetadas como paloma zurita no se amplificaron con los cebadores específicos correspondientes. En cambio, estas muestras sí se amplificaron con los cebadores específicos de paloma bravía, lo cual podría indicar un fraude derivado de la sustitución de paloma zurita por paloma bravía. Respecto a la cuantificación del contenido de la especie diana en los productos comerciales, sería necesario preparar rectas

estándar a partir de muestras con composición y tratamiento térmico idénticos a los de los productos analizados. Sin embargo, teniendo en cuenta la gran variedad de ingredientes que se utilizan en la preparación de los productos cárnicos así como la diversidad en los tratamientos térmicos aplicados en la industria cárnica, la preparación de diferentes rectas de calibrado para cada tipo de producto resulta inviable. Por tanto, el empleo de la técnica de PCR en tiempo real para el análisis de productos cárnicos queda limitado a una detección cualitativa de la especie diana, siendo imposible la cuantificación real del contenido de la misma.





In the last few years, the consumption of game bird meat and derived products has increased significantly in many parts of the world. Moreover, recently, typical game bird species are being produced in alternative poultry farms together with other avian species which has contributed to an increase in the offer of this kind of meat. The steadily growing demand for this type of meat and meat products as well as the high prices that consumers are ready to pay for them could lead to fraudulent practices of game bird meat substitution. Therefore, it is necessary to develop and apply rapid and accurate methods for the identification of inappropriately labelled game bird meat products. Recently, full attention has been turning towards application of DNA approaches for species identification. Among genetic techniques currently applied to meat authentication, polymerase chain reaction (PCR) is the most common approach due to its high power of sensitivity, specificity, and speed (Lenstra et al., 2001). Moreover, since DNA is a relatively stable molecule, PCR technology allows the analysis of processed or heat-treated samples.

Taking these considerations into account, the aim of this work was to develop several PCR-based techniques (polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP), PCR using species-specific primers, and real-time PCR) for the detection and identification of meats from the following game and alternative poultry farming species: quail (*Coturnix coturnix*), pheasant (*Phasianus colchicus*), guinea fowl (*Numida meleagris*), red-legged partridge (*Alectoris rufa*), chukar partridge

(*Alectoris chukar*), barbary partridge (*Alectoris barbara*), grey partridge (*Perdix perdix*), common pigeon (*Columba livia*), woodpigeon (*Columba palumbus*), stock pigeon (*Columba oenas*), Eurasian woodcock (*Scolopax rusticola*), song thrush (*Turdus philomelos*), ostrich (*Struthio camelus*), and capercaillie (*Tetrao urogallus*). The work is also intended to enable the differentiation among these meats and those from chicken (*Gallus gallus*), turkey (*Meleagris gallopavo*), Muscovy duck (*Cairina moschata*), and goose (*Anser anser*).

### **1. Development of PCR-RFLP techniques for the identification of meat and meat products from game and alternative poultry farming avian species**

In this study, 12S ribosomal RNA and D-loop mitochondrial genes were used as molecular markers for meat species identification because they have an adequate length and their mutation rate induces substantial genetic interspecies variation facilitating identification of closely related species. To amplify a common DNA fragment from the 12S rRNA gene of all the considered species, primers 12S-Fw and 12S-Rev designed by Fajardo et al. (2006) were used. On the other hand, the comparison of mitochondrial D-loop sequences available in the databases for several animal species allowed the design of DloopShort-Fw/DloopShort-Rev conserved primer pair. These primer pairs successfully amplified conserved regions of approximately 720 and 310 base pairs (bp) from the mitochondrial 12S rRNA and D-loop genes, respectively, of

quail, pheasant, red-legged partridge, chukar partridge, guinea fowl, capercaillie, woodpigeon, common pigeon, Eurasian woodcock, ostrich, chicken, turkey, Muscovy duck, and goose species. For ostrich species, only the 720 bp from the mitochondrial 12S rRNA gene was amplified. The information obtained after sequencing and restriction map analysis of the achieved 12S rRNA and D-loop sequences, allowed the selection of restriction endonucleases for the differentiation of meats from all the analyzed species by PCR-RFLP. The combination of *AluI* and *BfaI* endonucleases facilitated unequivocal identification of the target species in the PCR-RFLP technique based on the mitochondrial 12S rRNA gene, while the combination of *HinfI*, *MboI*, and *Hpy188III* endonucleases allowed the identification of the analyzed species when the D-loop gene was used as molecular marker.

The PCR-RFLP technique based on the D-loop region was suitable for the analysis of raw and heat-treated (121 °C for 20 min) meats, and commercial meat products (pickled meat, roasted meat, etc.) from the target species. However, the use of the PCR-RFLP method based on the 12S rRNA gene was limited to raw meat authentication not being suitable for cooked products because thermal treatment strongly accelerates DNA degradation leading to difficulties in amplifying the 720 bp fragment.

## **2. Development of PCR techniques using species-specific primers for the identification of meat and meat products from game and alternative poultry farming avian species**

The information obtained after alignment and comparison of the sequences obtained from the target species with 12S-Fw and 12S-Rev conserved primers allowed the design of primer pairs for the amplification of specific fragments of 129, 113, 141, 112, 123, 139, 133, 138, 110, 142, and 155 bp in the 12S rRNA gene of quail, pheasant, partridge species from the genus *Alectoris* (red-legged partridge, chukar partridge, and barbary partridge), red-legged partridge, grey partridge, guinea fowl, pigeon, Eurasian woodcock, song thrush, capercaillie, and ostrich, respectively. PCR results indicated effective amplification of the desired DNA segments in raw, pasteurized (72 °C for 30 min) and sterilized (121 °C for 20 min) meat samples. No PCR amplification signal was obtained when DNAs from other game and domestic animal species were tested, confirming the specificity of the designed species-specific primer pairs.

On the other hand, the detailed study of mitochondrial D-loop sequences from the considered species, obtained with Dloop-Short-Fw/DloopShort-Rev primers allowed the design of specific primer pairs for pigeon (147 bp), Eurasian woodcock (127 bp), and song thrush (154 bp). Nevertheless, due to the high degree of similarity between D-loop gene sequences obtained, it was not possible to design species-specific primers for the rest of species. For this reason, a longer polymorphic DNA region from the D-loop gene, potentially suitable for further species differentiation, was amplified and sequenced using DloopLong-Fw/DloopLong-Rev conserved primers. These primers were designed based on the comparison of

mitochondrial D-loop sequences available in the databases for several animal species. Bands obtained after PCR amplification with this set of primers ranged in size from 485 to 600 bp, depending on the species analyzed. The detailed study of the sequence multialignment permitted the design of specific primer pairs for quail (96 bp), pheasant (100 bp), partridge species from the genus *Alectoris* (104 bp), guinea fowl (106 bp), and capercaillie (97 bp). In addition, the comparison of D-loop gene sequences available in the databases for ostrich allowed the design of a primer pair for the amplification of a 148 bp specific fragment in this species. All the species-specific primer pairs amplified the desired DNA fragments in both raw and heat-treated meat samples. No amplification signal was observed when other game and domestic animal species were analyzed with the species-specific primers, demonstrating the high specificity of the PCR technique developed.

A common problem of PCR-based methods is failure of DNA amplification due to the presence of inhibitory substances in the samples. Inhibition influences the outcome of PCR reaction by lowering or completely preventing the amplification. Thus, it is essential to include positive controls in order to avoid false-negative results. For this reason, two positive control primer pairs, 18SEu-Fw/18SEu-Rev and 18SpEu-Dir/18SpEu-Inv oligonucleotides, were designed based on conserved nuclear 18S rRNA gene sequences available in the databases for various avian and mammal species. These primers amplified conserved

fragments of 89 or 141 bp, respectively, on the 18S rRNA gene of all game and domestic species analyzed, avoiding any possible false-negative amplification throughout the assays due to PCR inhibition.

To determine the sensitivity of the species-specific assays, amplifications were performed on series of experimental binary meat mixtures containing different percentages (0.1, 1, 5, 10, 25, and 50 %) of each target species in a chicken meat matrix. The detection limit of the PCR assays was set on 0.1 % for all the species tested. The sterilized treatment applied to samples did not modify the detection limit.

On the other hand, several commercial meat products obtained through a broad variety of technological processes (mincing, precooking, curing, cooking, sterilization, smoking, etc.) containing meat from the target species, were also analyzed to evaluate the usefulness of the PCR method developed. In most cases, the results obtained from the analysis of food products were in agreement with the declaration of the target species content on the label. Nevertheless, some partridge pâtés were not amplified with the corresponding species-specific primers. However, successful amplification was obtained with the positive control primers, suggesting a possible fraud in the labelling of these samples. Moreover, various partridge meat products labelled as red-legged partridge were not amplified with red-legged partridge species-specific primers. Nevertheless, these samples were correctly amplified with the primers used for the amplification of partridge species from

the genus *Alectoris*, and with the positive control primers. These results would indicate a possible fraud in the labelling of these products derived from the substitution of red-legged partridge meat with meat from other partridge species from the genus *Alectoris*.

In addition, the PCR assay was also used for the analysis of pet food products containing meat from the target species. The species-specific primer pairs successfully detected the presence of the target species in most of the analyzed samples. However, several pet food products containing pheasant meat were not amplified with pheasant-specific primers, which suggests a possible fraud in the labelling of these pet food products.

In this work, a PCR method was also developed for the detection of fraudulent labelling of red-legged partridge products. Red-legged partridge meat is greatly appreciated by consumers commanding a high price compared with meat from other partridge species. For this reason, the red-legged partridge label could be indiscriminately used in products containing meat from other partridge species, resulting in large profits for manufacturers and suppliers. Among red-legged partridge meat products sold in the market, two different names can be found on the label: "red-legged partridge" and "game red-legged partridge". The difference between red-legged partridge and game red-legged partridge products comes from the fact that red-legged partridge products are prepared from farm-raised red-legged partridges, whereas those products labelled as game red-legged partridge are

prepared from red-legged partridges coming from hunting activity. Taking into account that red-legged partridges are often crossed with chukar partridges in meat production farms to increase the productivity of the animals, both pure red-legged partridges and hybrids resulting from crosses between red-legged and chukar partridges could be present in products labelled as red-legged partridge. However, only pure red-legged partridge individuals can be present in game red-legged partridge meat products. Considering this aspect, the use of red-legged partridge species-specific primers based on the 12S rRNA mitochondrial gene presents some limitations for the detection of fraudulent labelling of red-legged partridge products. This is ascribed to the fact that because mitochondrial DNA is inherited maternally, red-legged partridge-specific primers will detect only those partridge individuals with red-legged partridge maternal lineage. Therefore, if chukar females are crossed with red-legged males, the resulting hybrid partridges will not be amplified by the specific red-legged partridge primers. Moreover, the use of these primers also presents limitations for the detection of fraudulent labelling of game red-legged partridge meat products because it does not allow for determination of whether the amplified DNA fragments correspond to pure red-legged partridges coming from hunting activity or to farm hybrid individuals resulting from crosses between red-legged females and chukar males.

Due to the impossibility to differentiate between pure and hybrid red-legged partridge on the basis of the 12S rRNA mitochondrial gene, a search and

review of the genetic markers already used to differentiate pure red-legged partridges from hybrids resulting from crosses between red-legged partridge and chukar partridge was carried out. After detailed study of the existing methods, a PCR technique developed by Arruga et al. (2007a) was selected. These authors reported the presence of a single nucleotide polymorphism (SNP) between red-legged partridge and chukar partridge species in a 441 bp fragment from intron 1 of the rhodopsin gene consisting of a thymine for cytosine base change at position 87. Based on this study, and to adapt the PCR methodology described by these authors for the analysis of heat-treated meat products, a pair of primers for the amplification of a 110 bp fragment containing the diagnostic SNP was designed. Sequencing of the generated rhodopsin amplicons revealed that red-legged partridges presented the nucleotide thymine in the diagnostic position of the rhodopsin gene sequence whereas chukar partridges presented the nucleotide cytosine. Hybrid individuals resulting from crosses between red-legged and chukar partridge species presented both nucleotides in the diagnostic position.

The results obtained after the analysis of the rhodopsin gene fragment from red-legged partridge and game red-legged partridge meat products revealed the existence of frauds involving the replacement of red-legged partridge meat with meat from pure chukar partridge individuals.

### **3. Development of real-time PCR techniques for the identification of meat**

#### **and meat products from game and alternative poultry farming avian species**

Real-time PCR is a powerful technique for the analysis of a given specific nucleic acid template present in a sample. The technique uses fluorescent molecules to monitor the generation of amplification products during each cycle of amplification, and the amount of template can be numerically obtained by advanced analytical methods. Real-time PCR is markedly more sensitive and accurate than other PCR-based approaches, giving quantitative results difficult to obtain with conventional end-point PCR.

In this work, several real-time PCR approaches were developed for the identification of meat from quail, pheasant, partridge species from the genus *Alectoris*, guinea fowl, common pigeon, woodpigeon, stock pigeon, Eurasian woodcock, song thrush, ostrich, and capercaillie. The non-specific fluorescent dye SYBR® Green and species-specific TaqMan® probes were employed as detection platform of the assays. To accomplish this objective, primer pairs previously designed for the amplification of specific DNA fragments in the mitochondrial 12S rRNA gene of quail, pheasant, partridge species from the genus *Alectoris*, guinea fowl, pigeon, Eurasian woodcock, song thrush, capercaillie, and ostrich, were used. Moreover, the alignment of 12S rRNA gene sequences available in the databases allowed the design of primers for the amplification of specific fragments in common pigeon (174 bp), woodpigeon (128 bp), and stock pigeon (121 bp). In addition,

another primer pair was designed for the amplification of a common fragment of approximately 148 bp from the 12S rRNA gene of the three pigeon species analyzed, since pigeon-specific primers designed previously for the analysis of pigeon meat using conventional PCR only allowed the amplification of common pigeon and woodpigeon species.

To accomplish the detection procedure in the real-time PCR approaches using TaqMan<sup>®</sup> probes, species-specific TaqMan<sup>®</sup> probes were designed for the detection of quail, pheasant, Eurasian woodcock, song thrush, ostrich, capercaillie, common pigeon, woodpigeon, and stock pigeon. In addition, a TaqMan<sup>®</sup> probe was designed for the simultaneous detection of the three pigeon species. On the other hand, a common probe was designed for the detection of partridge, guinea fowl, and common pigeon and woodpigeon. Moreover, another TaqMan<sup>®</sup> probe based on conserved 18S rRNA gene sequences available in the databases for various avian and mammal species was used together with 18SpEu-Dir and 18SpEu-Inv primers to normalize the values obtained with the specific primer pairs, and as positive control of the total PCR-amplifiable eukaryotic DNA present in the sample.

Each species-specific PCR system was tested for its selectivity and cross-reactivity, showing no cross amplification with DNAs from different game and domestic meat species. The ability of the real-time PCR methods for quantitative detection of the target DNAs was established through analysis of raw and sterilized experimental

binary mixtures containing different percentages (0.1, 1, 5, 10, 25, and 50 %) of each target species in a chicken meat matrix. For each species, a standard curve was determined with the  $C_p$  values generated from every meat percentage contained in the binary mixtures. Analysis of experimental raw and sterilized binary mixtures of the target species demonstrated the suitability of the assay for the quantification of the target DNAs in the mixtures. However, the heat treatment influenced the calibration curves originated in raw and sterilized meat mixtures. Therefore, different calibration curves should be used in accordance with the tissue matrix and the heat treatment applied in order to achieve reliable quantification of target species meat content.

Results obtained showed that the use of TaqMan<sup>®</sup> probes as detection system increased the specificity, efficiency, and sensitivity of the real-time PCR assays in comparison with the results obtained using SYBR<sup>®</sup> Green. The detection limit for both TaqMan<sup>®</sup> and SYBR<sup>®</sup> Green approaches was set on 0.1 % for all the species tested either on raw or sterilized meat samples.

Finally, several commercial meat products from the target species were analyzed using the real-time PCR systems based on TaqMan<sup>®</sup> probes in order to evaluate the usefulness of the PCR method developed. In most cases, the results obtained from the analysis of meat products were in agreement with the declaration of the target species content on the label. However, some partridge and pheasant pâtés, which were supposed to contain partridge and

pheasant, respectively, did not produce positive results with the corresponding species-specific real-time PCR systems. Nevertheless, successful results were obtained with the positive control system, suggesting a possible fraud in the labelling of these pâté samples. These results are in accordance with those obtained from the analysis of the same products using conventional PCR. In addition, several stock pigeon meat products were not amplified with the corresponding specific primers. However, these products were correctly amplified with common pigeon-specific primers, which suggest a possible fraud derived from the substitution of stock pigeon meat with meat from common pigeon. Regarding the applicability of the real-time PCR technique

for the quantification of the target species in commercial meat products it would be necessary to prepare appropriate calibration standards similar in composition and heat treatment to the commercial samples. However, taking into account the great variety of ingredients used in the preparation of commercial meat products, as well as the diversity of heat treatments applied by the meat industry, the preparation of calibration standards for each type of product is not feasible. Therefore, although in theory the present real-time PCR techniques have the potential for quantitative measurements, the reality is that their application for the analysis of real commercial meat products is limited to a qualitative detection of the target species.





*CAPÍTULO I*  
*Exposición General del*  
*Problema a Investigar*

---





La caza tiene una importante repercusión económica y social, desde su origen como actividad de supervivencia ancestral para el hombre, hasta la actualidad donde se considera no sólo como una actividad de ocio, deporte o turismo de naturaleza, sino como una nueva rama ganadera (ganadería cinegética).

En España, el consumo de carne de aves de caza se ha incrementado de forma notable en los últimos años debido, en parte, al auge de las explotaciones ganaderas dedicadas a la cría de estas aves y de otras especies de aves no cinegéticas en lo que hoy se conoce como avicultura alternativa. Sin embargo, los fraudes de sustitución de la carne de aves de caza y de la avicultura alternativa, así como de los productos derivados, son muy comunes debido al beneficio que se obtiene al vender carne de especies menos valoradas por otras más demandadas y de precio superior (Wolf y col., 1999; Brodmann y col., 2001; Hoffman y Wiklund, 2006). Muchas de estas especies se someten antes de su comercialización a operaciones de deshuesado, fileteado o picado que hacen desaparecer las características morfológicas que permitirían su identificación. Además, son cada vez más numerosos los productos que se someten a tratamientos tecnológicos como la pasteurización, esterilización, escabechado, etc., que modifican las características de color o textura dificultando más aún la identificación. Paralelamente, el comercio de especies protegidas o de productos procedentes de ellas ha contribuido a poner en peligro la biodiversidad, ocupando el tercer lugar en el ranking del comercio ilegal tras el tráfico de

armas y el de drogas. Asimismo, la caza furtiva amenaza la supervivencia de un elevado número de especie animales. Cada año, millones de ejemplares en peligro de extinción se capturan ilegalmente como trofeos de caza o para consumo humano (Teletchea y col., 2005). Estos factores, unidos al aumento en las exportaciones de este tipo de productos, justifican la necesidad de disponer de técnicas analíticas rápidas que permitan la adecuada identificación de la carne procedente de estas especies animales (Partis y col., 2000; Mafra y col., 2008).

Los procedimientos analíticos convencionales más utilizados en la identificación de especies animales en productos cárnicos incluyen diversas técnicas basadas en el análisis de las proteínas, como las electroforéticas (Arun y Ugur, 2000; Renon y col., 2003; Montowska y Pospiech, 2007), cromatográficas (Toorop y col., 1997; Chou y col., 2007), espectrométricas (Kulmyrzaev y col., 2007; Núñez y De la Haba, 2007) e inmunológicas (Chen y col., 2002; Ayaz y col., 2006). Una de las limitaciones que presentan las técnicas electroforéticas y cromatográficas es que pueden generar perfiles proteicos complejos y bastante similares para las distintas especies animales, dificultando su correcta identificación (Vallejo y col., 2005). Las técnicas espectrométricas requieren equipos sofisticados y análisis de calibración exhaustivos (Núñez y De la Haba, 2007). Con relación a las técnicas inmunológicas, los resultados obtenidos son más sencillos de interpretar, aunque su principal problema se presenta cuando los productos que se analizan han

sido sometidos a tratamientos térmicos que desnaturalizan las proteínas (Rao y Hsieh, 2008).

Las técnicas genéticas, concretamente aquellas basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), constituyen una estrategia idónea para la detección e identificación de especies animales en los alimentos. Los métodos genéticos de identificación de especies presentan importantes ventajas frente a las técnicas basadas en el análisis de proteínas. Fundamentalmente, la pequeña cantidad de muestra requerida para el análisis, el mayor grado de variabilidad genética examinado y la posibilidad de analizar muestras sometidas a distintos tratamientos tecnológicos, incluida la esterilización. Estas propiedades han convertido a las técnicas de PCR en un sistema óptimo para identificar la presencia de una determinada especie animal, tanto en productos crudos, como en aquellos sometidos a distintos tratamientos de procesado (Matsunaga y col., 1998; Hird y col., 2003; Lanzilao y col., 2005). Las técnicas de PCR convencionales son útiles para la identificación y la detección cualitativa de distintas especies animales en una mezcla. Sin embargo, la metodología de PCR en tiempo real es más adecuada cuando se pretende cuantificar el porcentaje de incorporación de una especie en un producto (Rodríguez y col., 2005; Laube y col., 2007).

Teniendo en cuenta estas consideraciones, en esta tesis doctoral se plantea la utilización de técnicas de PCR y PCR en tiempo real para la detección y cuantificación

de las principales especies de aves de caza y de la avicultura alternativa cuya carne se consume en España: codorniz (*Coturnix coturnix*), faisán (*Phasianus colchicus*), perdiz roja (*Alectoris rufa*), perdiz chukar (*Alectoris chukar*), perdiz moruna (*Alectoris barbara*), perdiz pardilla (*Perdix perdix*), paloma bravía (*Columba livia*), paloma torcaz (*Columba palumbus*), paloma zurita (*Columba oenas*), becada (*Scolopax rusticola*), zorzal común (*Turdus philomelos*), pintada (*Numida meleagris*) y avestruz (*Struthio camelus*). Por otra parte, a pesar de ser una especie protegida y vedada en todo el territorio nacional, también se plantea el desarrollo de técnicas de PCR para la identificación de urogallo (*Tetrao urogallus*), debido a la necesidad de controlar la caza y el comercio ilegal al que se somete esta especie. Asimismo, se aborda la diferenciación de estas carnes, de otras procedentes de especies domésticas de consumo habitual como el pollo, pavo, pato y oca. Para ello, los objetivos desarrollados han sido los siguientes:

- 1) Selección de marcadores genéticos adecuados. Se han empleado los genes mitocondriales 12S ARN ribosómico y D-loop, y el marcador nuclear que codifica para el intrón 1 de la rodopsina (RDP1).
- 2) Desarrollo de técnicas de PCR-RFLP para la identificación específica de carnes y productos cárnicos procedentes de todas las especies de interés. Para ello ha sido necesario:
  - Amplificar por PCR los marcadores seleccionados y secuenciar los

amplicones correspondientes a varios individuos de cada especie.

- Analizar las secuencias nucleotídicas obtenidas y elegir endonucleasas que han permitido, en cada caso, la obtención de perfiles de restricción especie-específicos.

- 3) Desarrollo de técnicas de PCR con cebadores específicos para la identificación de las especies de aves objeto de estudio en mezclas cárnicas crudas y sometidas a tratamientos térmicos, así como en productos cárnicos comerciales. Para ello ha sido necesario:

- Amplificar por PCR fragmentos de ADN conservados en todas las especies elegidas y secuenciar los

productos de PCR correspondientes a distintos individuos de cada especie.

- Analizar las secuencias obtenidas y diseñar cebadores especie-específicos.
- Emplear los cebadores diseñados en técnicas de PCR para la detección específica de las especies de interés en mezclas cárnicas y productos comerciales.

- 4) Desarrollo de técnicas de PCR en tiempo real para detectar y cuantificar la presencia de las aves objeto de estudio en mezclas cárnicas y productos comerciales, empleando dos sistemas de detección diferentes: el intercalador fluorescente SYBR<sup>®</sup> Green y las sondas de hibridación TaqMan<sup>®</sup>.



## *CAPÍTULO II*

### *Introducción*

---







## II.1. ESPECIES DE AVES DE CAZA Y DE LA AVICULTURA ALTERNATIVA

Las especies objeto de caza en el territorio nacional aparecen recogidas en el Real Decreto 1095/1989, de 8 de septiembre de 1989 (BOE, de 12 de septiembre de 1989). Estas especies se clasifican en dos grandes grupos: “caza mayor”, que integra a las especies de mamíferos de tamaño superior al zorro, y “caza menor”, que incluye los mamíferos de tamaño igual o inferior al zorro así como las aves de caza. Por otra parte, el Real Decreto 1118/1989, de 15 de septiembre de 1989 (BOE, de 19 de septiembre de 1989), incluye las especies de caza comercializables. Sin embargo, puesto que la caza es competencia exclusiva de todas y cada una de las Comunidades Autónomas, éstas pueden dictar su propia normativa en esta materia pudiendo excluir de la relación de especies cazables y comercializables aquellas que no existen en sus ámbitos territoriales y las que reciben medidas especiales de protección. Para clarificar estos aspectos, cada Comunidad Autónoma publica anualmente una Orden de Veda en la que se fija la relación de especies que se pueden cazar cada temporada. No obstante, las Órdenes de Veda siempre deben respetar la legislación estatal así como las disposiciones comunitarias y los diversos convenios internacionales suscritos y ratificados por España. En este sentido, a nivel estatal, los principales textos legislativos en los que se hace referencia a las especies susceptibles de ser cazadas son la Ley 42/2007, de 13 de diciembre de 2007, del Patrimonio Natural y de la Biodiversidad (BOE, de 14 de diciembre de

2007) y el Real Decreto 139/2011, de 4 de febrero de 2011, para el desarrollo del Listado de Especies Silvestres en Régimen de Protección Especial y del Catálogo Español de Especies Amenazadas (BOE, de 23 febrero de 2011). A nivel comunitario destacan la Directiva 2009/147/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 30 de noviembre de 2009, relativa a la conservación de las aves silvestres (DOUE, de 26 de enero de 2010), la Directiva 92/43/CEE del Consejo, de 21 de mayo de 1992, relativa a la conservación de los hábitats naturales y de la fauna y flora silvestres (DOCE, de 22 de julio de 1992) y el Convenio de Berna, de 19 de septiembre de 1979, relativo a la conservación de la vida silvestre y del medio natural de Europa (BOE, de 1 de octubre de 1986).

La gran diversidad de hábitats naturales presentes en España determina una elevada variedad y riqueza de especies de aves de caza. Las principales aves de caza cuya carne se consume en España son la codorniz (*Coturnix coturnix*), perdiz roja (*Alectoris rufa*), faisán (*Phasianus colchicus*), paloma bravía (*Columba livia*), paloma torcaz (*Columba palumbus*), paloma zurita (*Columba oenas*), perdiz moruna (*Alectoris barbara*), perdiz pardilla (*Perdix perdix*), becauda (*Scolopax rusticola*) y zorzal común (*Turdus philomelos*). Todas estas especies están incluidas en el Real Decreto 1095/1989, a excepción de la perdiz pardilla. Respecto a la comercialización de estas aves, sólo la codorniz, perdiz roja, perdiz moruna, faisán, paloma torcaz y paloma zurita aparecen recogidas en el Real Decreto 1118/1989 como especies comercializables.

Además, este Real Decreto especifica que en el caso de la codorniz y la paloma zurita, sólo se permite la comercialización de ejemplares procedentes de granjas cinegéticas, palomares industriales y cotos de caza expresamente autorizados para la producción y venta de piezas de caza vivas.

Por otra parte, otra especie que despierta un gran interés es el urogallo (*Tetrao urogallus*). Aunque esta ave no es una especie cinegética en el territorio nacional, existe constancia de su caza furtiva así como de la comercialización ilegal de su carne.

En los últimos años, a pesar de la riqueza de aves de caza presentes en España, la presión de la actividad cinegética en el medio natural y la del desarrollo agrario han ido mermando paulatinamente las poblaciones de aves silvestres. Esta caída progresiva del volumen de aves abatidas ha sido compensada, en gran parte, mediante el desarrollo de su crianza en cautividad, que ha experimentado un espectacular crecimiento. Esta crianza se desarrolla bajo dos vertientes: por un lado, como fuente directa de carne y de otros productos cárnicos que siguen los circuitos comerciales convencionales y, por otro, como sistemas de repoblación de estaciones naturales y cinegéticas, pudiendo ser posteriormente objeto de caza deportiva.

La producción de aves de caza se incluye dentro de la llamada “avicultura alternativa” que engloba aquellas formas de avicultura que difieren de la avicultura clásica o convencional, ya sea en el sistema de producción empleado, o bien en las

especies utilizadas. Este tipo de avicultura se ha visto favorecido en los últimos años como consecuencia no sólo del incremento en la producción de especies cinegéticas, sino también debido a la aparición de explotaciones dedicadas a la cría de aves no cinegéticas distintas de las especies convencionales. Entre estas especies de aves no cinegéticas destacan la pintada (*Numida melegris*), perdiz chukar (*Alectoris chukar*) y avestruz (*Struthio camelus*). La legislación relativa a la producción y comercialización de especies de avicultura alternativa aparece recogida principalmente en el Real Decreto 1084/2005, de 16 de septiembre de 2005, de ordenación de la avicultura de carne (BOE, de 29 de septiembre de 2005), el Real Decreto 640/2006, de 26 de mayo de 2006, por el que se regulan determinadas condiciones de aplicación de las disposiciones comunitarias en materia de higiene, de la producción y comercialización de los productos alimenticios (BOE, de 27 de mayo de 2006) y los Reglamentos 1234/2007 del Consejo, de 22 de octubre de 2007 (DOUE, de 16 de noviembre de 2007) y 543/2008 de la Comisión, de 16 de junio de 2008 (DOUE, de 17 de junio de 2008) por los que se establecen las normas de comercialización de las aves de corral.

Como ya se ha señalado, las principales aves de caza y de la avicultura alternativa en España son la codorniz, perdiz roja, perdiz moruna, perdiz pardilla, perdiz chukar, faisán, pintada, paloma bravía, paloma torcaz, paloma zurita, becada, zorzal común, urogallo y avestruz.

- **CODORNIZ**

La codorniz (*Coturnix coturnix*) es un ave originaria de África, Asia y Europa perteneciente a la familia Phasianidae. Su clasificación taxonómica es confusa, no existiendo un acuerdo sobre el número de subespecies existentes, que oscilan entre cinco y diez (Puigcerver y col., 2001). Las subespecies presentes en nuestro país son la codorniz común europea (*Coturnix coturnix coturnix*) y la codorniz japonesa (*Coturnix coturnix japonica*). La primera es un ave salvaje, más apta para la caza y repoblación, mientras que la segunda es un ave doméstica, más adecuada para la producción intensiva (Gorrachategui, 1996).

La codorniz común europea (*Coturnix coturnix coturnix*) es la más pequeña de las galliformes ibéricas cazables, con un peso aproximado de 100 g. Tiene un plumaje de color pardo en el dorso, con listas de tono más oscuro y salpicado de motas claras. El pecho presenta un color marrón oscuro, anaranjado o rojizo en los machos (*Figura 1a*) y crema claro con manchas oscuras en las hembras. Los machos presentan además una mancha en forma de ancla de color negro en la garganta que no está presente en las hembras (Carulla, 2007). A diferencia de otras aves de este orden, es una especie migratoria aunque en algunas regiones de España, como Extremadura y Andalucía, se ha hecho sedentaria. Entre los meses de febrero y marzo viene a España procedente del norte de África y una vez realizada la puesta se retira ante la llegada de los primeros fríos que suelen producirse en octubre (Cecilia, 1991). Son aves polígamas

con una gran capacidad reproductora ya que pueden realizar hasta tres puestas en la misma temporada. La puesta consta de entre ocho y trece huevos, que son incubados exclusivamente por la hembra durante veintiún días. Los polluelos son nidífugos y altamente precoces, alcanzando la madurez sexual antes de los cincuenta días de vida.

La codorniz japonesa (*Coturnix coturnix japonica*) es originaria de China y Japón y fue introducida en Europa durante el siglo pasado. Debido a sus cualidades como ponedora y a su mayor potencial de crecimiento en comparación con la codorniz común, es la subespecie más frecuentemente empleada en las explotaciones industriales para producción de carne y huevos.

- **PERDICES**

***Perdiz roja***

La perdiz roja (*Alectoris rufa*) o también llamada perdiz común, pertenece al orden Galliformes y a la familia Phasianidae. Es una especie endémica del suroeste de Europa, distribuida por toda la península Ibérica, Francia, noroeste de Italia, y las islas italianas de Elba y Córcega. También se ha introducido en buena parte del suroeste de Inglaterra, islas Azores, Baleares, Canarias, Madeira, y con poco éxito en Estados Unidos, Nueva Zelanda y Europa central (Del Hoyo y col., 1994; Snow y Perrins, 1998). A pesar de que durante un tiempo se consideró que existían tres subespecies, dos en la península Ibérica (*Alectoris rufa hispanica* en el norte y *Alectoris rufa intercedens* en el sur) y otra en Francia e Italia (*Alectoris rufa rufa*),



**Figura 1.** Principales especies de aves de caza y de la avicultura alternativa en España: codorniz (*Coturnix coturnix*) (**1a**), perdiz roja (*Alectoris rufa*) (**1b**), perdiz moruna (*Alectoris barbara*) (**1c**), perdiz pardilla (*Perdix perdix*) (**1d**), perdiz chukar (*Alectoris chukar*) (**1e**), faisán (*Phasianus colchicus*) (**1f**) y pintada (*Numida meleagris*) (**1g**).

los últimos estudios parecen indicar que no existen diferencias genéticas entre ellas, tratándose de la misma especie que desarrolla distintas características fenotípicas en función del hábitat (Ballesteros, 1998; Sainsbury, 2002).

Su coloración se compone de tonos castaños en el dorso, obispillo y pecho gris azulado, vientre canela y plumas costales con un característico diseño formado por una banda blanca, una negra y una marrón. La cara es de color blanco y está enmarcada por una franja negra que se inicia en el pico, atraviesa el ojo y se prolonga hasta la garganta y el pecho en forma de pequeñas listas negras no presentes en el resto de especies del género *Alectoris*. Tanto el pico como la carúncula ocular y las patas son de color rojo vivo, que da nombre a la especie (Figura 1b). El dimorfismo sexual es poco marcado, caracterizado únicamente por el mayor tamaño y robustez del macho, así como por la presencia de espolones anchos y bien definidos en las patas, mientras que estos no aparecen en las hembras o bien son rudimentarios, puntiformes y sin anchura en la base (Buxadé, 1999; Villanúa, 2007).

La perdiz roja es una especie sedentaria y marcadamente territorial. Su hábitat principal lo constituyen las zonas de matorral denso con pastizales y con parcelas cultivadas de cereales. Son animales gregarios que permanecen agrupados en bandos familiares prácticamente todo el año. Estos bandos sólo se rompen en la época reproductiva, que se inicia con la formación de parejas monógamas a partir de enero y febrero. Entre abril y mayo, la hembra realiza

la puesta de doce a dieciocho huevos en el suelo y con frecuencia pone dos veces en nidos simultáneos, incubando uno de ellos y dejando que el macho lo haga en el otro. Tras un periodo de incubación de veintitrés a veintiséis días, nacen las crías o perdigones, que se harán independientes a las seis semanas (Hansen-Catta y col., 2003).

### ***Perdiz moruna***

Al igual que la perdiz roja, la perdiz moruna (*Alectoris barbara*) es una gallinácea perteneciente a la familia Phasianidae y al género *Alectoris*. Es autóctona del norte de África, donde aparece ampliamente distribuida desde Argelia y Marruecos, hasta Egipto. Su principal núcleo en Europa se localiza en la isla de Cerdeña, donde fue introducida por los romanos. También se encuentra en Gibraltar, Madeira, algunas zonas de Cádiz y en las islas Canarias, donde fue introducida en el siglo XIX con fines cinegéticos (Martí y Del Moral, 2003). Se han descrito cuatro subespecies, estando dos de ellas presentes en el territorio español: *Alectoris barbara barbara*, (en Ceuta, Melilla y Cádiz) y *Alectoris barbara koenigi* (en las islas Canarias).

Presenta notables similitudes morfológicas con la perdiz roja, así como un comportamiento y unas características reproductivas similares. La principal diferencia entre ambas radica en el plumaje de la cara y el cuello. En la perdiz moruna, la cara y la garganta son grises y no aparece la franja negra presente en la perdiz roja. Además, presenta un característico collar rojizo con motas blancas (Figura 1c).

### ***Perdiz pardilla***

La perdiz pardilla o perdiz gris (*Perdix perdix*) es un ave galliforme de la familia Phasianidae, distribuida por toda la región euroasiática, desde el norte de la península Ibérica hasta Siberia central y China. Además se han realizado una serie de repoblaciones en el siglo XX en distintas partes de Norteamérica que han propiciado su establecimiento silvestre en ese continente (Potts, 1986). En Europa se encuentra en las llanuras descubiertas, los campos de cereales y zonas de matorral. En la península Ibérica, los principales núcleos poblacionales ocupan zonas montañosas de la cordillera Cantábrica, los Pirineos y el Sistema Ibérico. Se han descrito ocho subespecies, siendo la *Perdix perdix hispaniensis* la subespecie presente en nuestro país.

La perdiz pardilla se diferencia de las perdices del género *Alectoris* por su menor tamaño y la diferente coloración de su plumaje. Tiene la frente, cara y garganta de color anaranjado. El cuello, la parte superior del pecho y las patas son grises, y el dorso de las alas, la espalda y la parte superior de la cabeza son de color pardo, lo cual confiere al animal un gran mimetismo con su entorno. Los flancos están rayados de castaño y blanco, y en el bajo pecho los machos presentan una mancha de color castaño oscuro que tiene forma de herradura y que alcanza parte del vientre, destacando mucho sobre el fondo blanco (Figura 1d). En las hembras, esta mancha es menos marcada o está ausente (Domefauna, 1990).

Al igual que la perdiz roja y la perdiz

moruna, la perdiz pardilla vive en grupos familiares que sólo se deshacen durante la época reproductiva. Esta comienza a finales de invierno, con la formación de parejas monógamas. La puesta tiene lugar a mediados de abril o mayo, en un nido construido en el suelo y cubierto de hierba y hojas secas. Los perdigones, nidifugos, nacen tras un periodo de incubación de aproximadamente veinticuatro días (Cortay y col., 2003).

Por otra parte, como se ha mencionado anteriormente, debe destacarse que la perdiz pardilla no aparece en la lista de especies cazables contempladas en el Real Decreto 1095/1989. No obstante, su caza ha estado permitida en varias Comunidades Autónomas incluidas Galicia, Asturias, Cantabria, La Rioja, Castilla y León, Aragón y Cataluña. Sin embargo, debido a la fuerte regresión que ha sufrido la especie en las últimas décadas, llegando incluso a estar en peligro de extinción en algunas zonas de España como La Rioja y Navarra, su caza se ha ido prohibiendo en las Comunidades Autónomas en las que existía. Actualmente, la caza de la perdiz pardilla está vedada en todo el territorio nacional, a excepción de en Cataluña, donde su caza está permitida bajo condiciones muy estrictas (Resolución AAM/1530/2011, 2011). En el resto de Europa la perdiz pardilla es una especie abundante y cazable en todos los países en los que está presente.

### ***Perdiz chukar***

La perdiz chukar (*Alectoris chukar*) pertenece al género *Alectoris* al igual que la perdiz roja y la perdiz moruna. Su área de

distribución original es muy amplia, extendiéndose desde Bulgaria, Turquía y Chipre, hasta las costas del Pacífico, atravesando las zonas centrales de Asia. También se ha introducido con éxito en Norteamérica. En España fue introducida en granjas productoras de carne como alternativa a la perdiz roja, ya que se adapta mejor a la cría en cautividad y tiene una capacidad de engorde y una potencialidad reproductiva superiores.

Al igual que la perdiz moruna, posee un plumaje y un comportamiento parecido al de la perdiz roja aunque presenta una serie de características distintivas que permiten la diferenciación entre especies. La cabeza es gris con una línea negra similar a la que aparece en la perdiz roja, pero no presenta listas en el pecho y la garganta. Por otra parte, el barrado de los flancos es de color negro y blanco, no apareciendo tonalidades marrones como ocurre en la perdiz roja (*Figura 1e*).

#### • FAISÁN

El faisán común (*Phasianus colchicus*) es un ave galliforme perteneciente a la familia Phasianidae, de la que se han documentado cerca de treinta subespecies distintas. Originario de Asia, fue introducido por los romanos durante el siglo VI en gran parte de Europa. También está presente desde finales del siglo XIX en Norteamérica, así como en diversas zonas de Sudamérica y Australia. Las dos subespecies más extendidas en la península Ibérica son el faisán de Mongolia (*Phasianus colchicus mongolicus*) y el faisán de collar (*Phasianus colchicus torquatus*) (Gorrachategui, 1996).

El faisán es un ave robusta, de porte majestuoso y de mucho mayor tamaño que otras galliformes. Presenta un evidente dimorfismo sexual caracterizado por el vistoso plumaje de los machos. Estos tienen la cabeza y el cuello de color azul y verde metalizado, con carúnculas rojas alrededor de los ojos (*Figura 1f*). Debido a la variedad de subespecies introducidas, el plumaje del resto del cuerpo es muy variable, destacando colores vistosos rojizos y ocre, moteados de negro y blanco, y una larga cola barrada que puede llegar hasta los 50 cm. A menudo presentan un estrecho collar blanco. La hembra, de menor tamaño que el macho, posee un plumaje de color gris-parduzco moteado de negro, siendo la cola mucho más corta que la del macho (Cortay y col., 2003).

Son animales capaces de adaptarse a muchos medios diferentes aunque su hábitat natural son los lugares boscosos con alternancia de prados y arbustos, y cercanos a los cursos de agua. Durante el periodo de celo (entre marzo y abril), los machos adoptan un comportamiento muy territorial, compitiendo de forma agresiva por el control de las hembras. Generalmente polígamos, suelen fecundar a varias hembras, que anidan en solitario tras aparearse. El nido consiste en una depresión del terreno tapizada por hierbas y plumón donde la hembra pone de diez a doce huevos, que son incubados durante veinticuatro días. Los polluelos, nidífugos, son criados por la madre hasta el otoño, momento en el que la familia se separa. Alcanzan la madurez sexual al año (Hansen-Catta y col., 2003).



- **PINTADA**

La pintada común (*Numida meleagris*) o gallina de Guinea es un ave galliforme perteneciente a la familia Numididae. Son aves originarias de las sabanas del África occidental, donde mantienen su hábitat natural, en estado salvaje. Domesticada en Egipto y en Grecia, fue introducida en Europa por los romanos en primer lugar y posteriormente por los navegantes portugueses provenientes de África a finales del siglo XV. En la actualidad se ha extendido mundialmente, siendo criada en cautividad en multitud de países. Existen nueve subespecies salvajes aunque la variedad doméstica descende de la subespecie *Numida meleagris galeata* o pintada occidental (Belshaw, 1985; Scherf, 2000).

Poseen un cuerpo de forma ovoide, con un cuello delgado y pico corto. La cabeza, pequeña, corta y desnuda de plumas, presenta una coloración blanca o azulada, con carúnculas de color rojo intenso y una característica protuberancia córnea de forma piramidal y tono pardo-rojizo. El plumaje es de color gris-azulado, con manchas blancas en forma de lenteja (*Figura 1g*). La hembra es similar al macho, aunque de menor tamaño. La pintada doméstica presenta un peso vivo superior al de la pintada salvaje así como carúnculas de mayor tamaño (Abad y col., 2003).

Son aves gregarias en su estado salvaje, formando grupos de hasta varios centenares de individuos. Al llegar la primavera, los grupos se separan y forman parejas monógamas, comenzando el periodo reproductivo. Las pintadas salvajes realizan

una puesta al año, de entre seis y doce huevos, en un nido construido entre la hierba, mientras que las pintadas domésticas suelen poner de setenta a cien huevos, si se crían en parques, o hasta ciento setenta huevos si son criadas en jaulas (Muriel y Serrano, 2009). Las crías o pintadones nacen tras un periodo de incubación de veinticuatro a veintiocho días, y alcanzan la madurez sexual entre las veintisiete y treinta semanas.

- **PALOMAS**

- Paloma bravía***

La paloma bravía (*Columba livia*), pertenece al orden Columbiformes y a la familia Columbidae, en la que también se incluyen el resto de especies de paloma. Fue domesticada por el hombre hace miles de años, dando lugar a la paloma doméstica (*Columba livia* var. *domestica*) con la que se han producido múltiples cruces. Como ave doméstica presenta una distribución cosmopolita. Sin embargo, la distribución de la paloma bravía silvestre se limita a las Islas Británicas, los países europeos de la cuenca mediterránea, Oriente Medio y Asia central (Del Hoyo y col., 1997). En España está presente en todo el territorio, incluidas las islas Baleares, Canarias, Ceuta y Melilla. Las poblaciones silvestres ocupan principalmente los acantilados costeros, las paredes rocosas de sierras y cortados fluviales, mientras que la forma doméstica se asienta mayoritariamente en las ciudades y las áreas rurales, sobre edificios y otras construcciones realizadas por el hombre. La tendencia general de las poblaciones domésticas es ascendente, llegando a convertirse en verdaderas plagas en algunas

ciudades. Sin embargo, las poblaciones silvestres se encuentran en declive debido al deterioro del hábitat y la hibridación con formas domésticas (Martí y Del Moral, 2003).

El plumaje de la paloma bravía silvestre es gris azulado, más pálido en la espalda, con tonos verdes y violáceos a los lados del cuello. La parte superior de la cola es de color blanco y en las alas posee dos barras de color negro. La cabeza, el pecho y el vientre tienen un tono gris azulado más oscuro que las plumas de la espalda (*Figura 2a*). En cambio, el plumaje de las palomas domésticas es muy variable, pudiendo ser también de color marrón pálido u oscuro, gris, negro o blanco.

Son aves sedentarias, que viven en bandos de distinto tamaño. Durante la época reproductiva (de marzo a octubre) forman parejas monógamas que anidan en agujeros y grietas de rocas y acantilados. Pueden realizar hasta cuatro puestas al año, de dos huevos cada una. La incubación, dura de diecisiete a diecinueve días y corre a cargo de ambos progenitores. Los polluelos o pichones, nidícolas, son alimentados con la llamada "leche de buche" y permanecen en el nido aproximadamente un mes.

### ***Paloma torcaz***

La paloma torcaz (*Columba palumbus*) es la paloma de mayor tamaño de Europa. Tiene una distribución paleártica amplia, que abarca la mayor parte de Europa y norte de África hasta Asia central. La subespecie presente en Europa es la *Columba palumbus palumbus*, existiendo además otras tres subespecies distribuidas en distintas zonas de Asia y Madeira. En

España nidifica prácticamente en la totalidad del territorio, con excepción de Canarias y Melilla (Martí y Del Moral, 2003). Es frecuente en todo tipo de hábitats con presencia de árboles, incluso en jardines urbanos.

A pesar de ser un ave típicamente migratoria, el comportamiento de las poblaciones es muy variable. Las poblaciones escandinavas son totalmente migratorias y se desplazan cada año siguiendo la vía atlántica para invernar en España y Portugal. Las poblaciones de Europa central son también migratorias pero, en este caso, siguen la vía continental y pasan el invierno en Grecia, Italia o sur de Francia. En cambio, las poblaciones del centro y suroeste europeos, de Dinamarca a España, son más bien sedentarias, y sólo realizan pequeños desplazamientos en función de las condiciones meteorológicas y de la disponibilidad de alimentos (Cortay y col., 2003).

El plumaje de la paloma torcaz es de color gris azulado, con la pechuga y el cuello gris rosado. Las palomas adultas presentan una franja blanca en el ala y una mancha del mismo color a ambos lados del cuello (*Figura 2b*), que permiten diferenciarlas de otras palomas europeas como la paloma bravía (*Columba livia*) y la paloma zurita (*Columba oenas*). Son aves de carácter gregario que forman grandes bandos, sobre todo en otoño e invierno. Los bandos se separan en la época reproductiva que comienza a principios de marzo, formándose parejas que permanecen unidas durante las dos o tres puestas que tienen lugar hasta agosto. Ambos sexos construyen juntos un



**Figura 2.** Principales especies de aves de caza y de la avicultura alternativa en España: paloma bravía (*Columba livia*) (2a), paloma torcaz (*Columba palumbus*) (2b), paloma zurita (*Columba oenas*) (2c), avestruz (*Struthio camelus*) (2d), becada (*Scolopax rusticola*) (2e), zorzal común (*Turdus philomelos*) (2f) y urogallo (*Tetrao urogallus*) (2g).

nido en las ramas de los árboles, en el que depositan dos huevos. Los pichones nacen tras un periodo de incubación de diecisiete días y levantan el vuelo a los treinta y tres o treinta y cuatro días de edad.

### **Paloma zurita**

La paloma zurita (*Columba oenas*) se extiende por toda Europa, norte de África y Asia. Sólo se han descrito dos subespecies: *Columba oenas oenas*, presente en todo el área de distribución, y *Columba oenas yarkandensis*, que ocupa Asia central. Al igual que en el caso de la paloma torcaz, las poblaciones de paloma zurita del norte y centro de Europa realizan migraciones durante el invierno, mientras que en los países del suroeste europeo vive de forma sedentaria. En España, están presentes durante todo el año en el área mediterránea, valle del Ebro y meseta norte. Las poblaciones invernantes se distribuyen por la mayor parte de la península Ibérica, aunque principalmente en el eje noreste-suroeste (Martí y Del Moral, 2003). Diversos estudios indican un aparente descenso poblacional durante las últimas décadas, tanto en España como en diversos países de Europa (Blanco y González, 2006).

Es de menor tamaño que la paloma torcaz y aproximadamente igual que la paloma bravía. Se diferencia de ambas por la ausencia de marcas blancas en su plumaje y por la coloración negro azabache de sus ojos, pues la torcaz y la bravía los tienen amarillos o anaranjados. Presenta una coloración gris azulada, con dos franjas negras cerca del borde posterior del ala, y dos manchas iridiscentes a ambos lados del

cuello (Figura 2c).

La paloma zurita es un ave gregaria, de costumbres muy similares a las de la paloma torcaz. Durante la época reproductiva cría en huecos de árboles y edificios en ruinas, en los que coloca dos huevos que serán incubados por ambos progenitores. El periodo de incubación dura aproximadamente dieciocho días tras los cuales nacen los pichones que abandonarán el nido entre los veinticinco y treinta días.

### • **AVESTRUZ**

El avestruz (*Struthio camelus*) pertenece al grupo de las Ratites, que comprende diversas especies de aves cuya característica común es su incapacidad para volar así como la ausencia de quilla en el esternón. El avestruz es el único miembro de la familia Struthionidae y es el ave de mayor tamaño existente, llegando a alcanzar hasta 3 m de altura y 150 kg de peso. Se han descrito seis subespecies de las cuales sólo cuatro siguen existiendo en la actualidad: *Struthio camelus australis* o avestruz de cuello negro, nativa del sur de África, *Struthio camelus camelus* o avestruz de cuello rojo, originaria del norte y oeste de África, *Struthio camelus massaicus* o avestruz masai, en el este de Kenia y Tanzania, y *Struthio camelus molybdophanes* o avestruz de cuello azul, presente en el norte de Kenia, Somalia y Etiopía. Se describen otras dos subespecies más actualmente desaparecidas: *Struthio camelus syriacus* o avestruz árabe, que se extinguió a mediados de los años noventa como consecuencia de la caza indiscriminada, y *Struthio camelus spatzi*, en el noreste africano, que hibridó

totalmente con *Struthio camelus camelus*. Finalmente se habla de la variedad *Struthio camelus domesticus* para referirse a los animales domesticados que se encuentran en las explotaciones industriales y que han sido obtenidos mediante cruzamientos sucesivos entre distintas subespecies (Buxadé, 1999; Bello, 2001).

El avestruz presenta una serie de características que lo diferencian del resto de las aves. Sus pies poseen únicamente dos dedos con cuatro falanges cada uno. Presentan un largo cuello desnudo o cubierto de plumas pequeñas y suaves. Los muslos también están prácticamente desprovistos de plumas. Sus dos alas no son funcionales para el vuelo pero le sirven a la hora de realizar el cortejo en la época reproductiva o como abanico en épocas muy calurosas. Las extremidades posteriores son muy fuertes siendo de gran utilidad para su defensa y la carrera, pudiendo alcanzar velocidades punta de hasta 70-80 km/h. Los individuos adultos presentan un claro dimorfismo sexual en su plumaje. Los machos son negros con plumas blancas en los extremos de las alas y en la cola (*Figura 2d*), mientras que las hembras presentan un plumaje más uniforme de color pardo o grisáceo (Anderloni, 1998).

Es un ave adaptada a planicies áridas o semiáridas con pastos, pero se adapta bien a un amplio rango de condiciones climáticas y localizaciones geográficas. Son animales gregarios que viven en bandos de entre diez y cincuenta individuos. Durante la época reproductiva (desde marzo-abril hasta octubre-noviembre)

se agrupan en familias formadas por un macho y de tres a cinco hembras. La puesta se realiza por nidada común, es decir, las hembras ponen sus huevos en el mismo nido, los cuales serán incubados por la hembra dominante durante el día y por el macho durante la noche. En las explotaciones industriales, la unidad de producción es el trío, compuesto por un macho y dos hembras. El avestruz salvaje normalmente hace una sola puesta al año, de unos quince huevos, mientras que el doméstico, debido a una mejor alimentación y selección de la especie, y a que cada día se le sacan los huevos del nido, pone unos setenta huevos al año pudiendo llegar en algunos casos hasta los cien huevos anuales. Tras un periodo de incubación de aproximadamente cuarenta y dos días nacen los polluelos, los cuales presentan una coloración marrón y bandas de plumas negras a lo largo del cuerpo. Las hembras de avestruz alcanzan su madurez sexual a partir de los dos años y medio de edad, mientras que los machos no la alcanzan hasta los tres años y medio o cuatro (Asturias y Garita, 2001).

- **BECADA**

La becada (*Scolopax rusticola*) o también llamada chocha perdiz, sorda, pitorra, oilagorra o arcea, es un ave migratoria de la familia de los Charadriiformes, subfamilia de los Scolopácidos, que se distribuye en latitudes medias del Paleártico (Hidalgo y Rocha, 2001). Dentro de su esquema de distribución se distinguen tres grandes zonas: la zona de cría en el norte del continente Europeo, el área de invernada en áreas meridionales de Europa, norte de

África y Oriente Medio, y una franja intermedia donde se solapan la cría y la invernada (Ferrand y col., 2008). En la península Ibérica, las poblaciones de becada son principalmente invernantes y llegan de octubre a diciembre procedentes de Rusia y Escandinavia. Se distribuyen por todo el territorio nacional, incluidas las islas Baleares y Canarias, y permanecen en él hasta principios de marzo. También existe una pequeña población sedentaria en las montañas del Pirineo, cordillera Cantábrica y Sistema Ibérico (Hansen-Catta y col., 2003).

Es un ave de tamaño mediano, y aspecto robusto y compacto. Dos rasgos la diferencian: su largo pico (entre seis y ocho centímetros) y sus grandes ojos negros situados en la parte superior de la cabeza. El pico es responsable del nombre del animal, puesto que becada proviene del latín *beccus* (pico). Su parte superior tiene la facilidad, por medio de un tendón, de abrirse hacia arriba en su extremo, lo cual facilita a la becada escarbar en el suelo para extraer los gusanos y larvas de los que se alimenta. Su plumaje, un jaspeado de marrones, grises, blancos y negros, constituye un eficaz medio de camuflaje en su entorno (*Figura 2e*). Cabe resaltar que no presenta dimorfismo sexual marcado aunque las hembras suelen tener las alas y la cola más cortas, y el pico y tarso más largos que los machos.

El hábitat óptimo de la becada está compuesto por bosques mixtos que alternan sotobosques densos y claros con pastos o praderas en zonas colindantes. Son animales generalmente solitarios, de actividad diurna en primavera y verano y

fundamentalmente nocturna en otoño e invierno. La época de celo (entre febrero y julio) se caracteriza por la denominada *croule* de los machos, en la que realizan una serie de vuelos repetidos al amanecer y al anochecer acompañados de un canto característico similar al croar de una rana, y cuya misión es buscar hembras receptivas y señalar a las mismas su presencia. La hembra realiza una puesta de tres a cinco huevos, casi siempre cuatro, en un nido situado en el suelo recubierto de hierba y hojas secas. Tras un periodo de incubación de veinte a veinticuatro días a cargo de la hembra, nacen los polluelos cubiertos de un plumón amarillo rosado, con el cuerpo estriado a lo largo por unas líneas marrones que los hace casi invisibles al mimetizarse con el suelo. Son nidífugos, abandonan el nido a los tres días y permanecen con la hembra dos o tres semanas. Alcanzan la madurez sexual al año de vida (Duriez, 2003).

- **ZORZAL COMÚN**

El zorzal común (*Turdus philomelos*) es un ave de pequeño tamaño perteneciente al orden Passeriformes y a la familia Turdidae. Se encuentra distribuido por toda la zona paleártica, siendo más escaso en la cuenca del Mediterráneo. También existen poblaciones introducidas en Nueva Zelanda y sureste de Australia (Hagemeijer y Blair, 1997). Las poblaciones del norte y este de Europa son migratorias y en otoño abandonan las zonas de cría para desplazarse hacia el sur. En España ocupa de forma sedentaria el tercio norte peninsular, apareciendo de forma más dispersa en las

cordilleras centrales y raramente en el sur. Las poblaciones invernantes, que llegan a España en septiembre, se distribuyen por todo el territorio nacional. Se han descrito cuatro subespecies, siendo el *Turdus philomelos philomelos* la subespecie más común en Europa (Martí y Del Moral, 2003).

Poseen un cuerpo bastante compacto, con una cola corta. La coloración del plumaje es parda en el dorso mientras que el pecho es de color blanco con una serie de manchas oscuras. La parte inferior de las alas y los flancos presentan tonos ocre (Figura 2f).

Son aves vivaces y activas, que pasan la mayor parte del tiempo en movimiento y buscando alimento. Viven en grupos más o menos importantes en zonas boscosas con arbustos y matorrales. En la época reproductiva (entre febrero y junio), los machos atraen a las hembras con su armonioso canto, formándose parejas monógamas. El nido, construido exclusivamente por la hembra sobre arbustos, setos, o árboles a poca altura, está formado por un cuenco hecho con hierba seca, ramitas, musgo, hojas secas y algún líquen, amasados con barro. Realizan dos o tres puestas anuales, de tres a cinco huevos, que son incubados por la hembra durante aproximadamente trece días. Los polluelos, nidícolas, son atendidos por ambos progenitores y abandonan el nido entre los doce y quince días (Hansen-Catta y col., 2003).

- **UROGALLO**

El urogallo (*Tetrao urogallus*) es un ave perteneciente a la subfamilia de las

Tetraónidas, siendo la de mayor tamaño entre las especies de dicho grupo. El término urogallo hace referencia a su hermosa cola (del griego *oura*) y a su pertenencia al orden Galliformes. Es un animal característico de los bosques boreales de coníferas que, gracias a las grandes glaciaciones, pudo extender su presencia a todo el área paleártica.

Los urogallos presentan un acusado dimorfismo sexual, siendo el tamaño de los machos, que pueden llegar a alcanzar los 5 kg, aproximadamente el doble que el de las hembras. En cuanto a su plumaje, el cuerpo del macho es de color gris pizarra con brillantes reflejos de un verde metálico en el pecho. La cola es negra con algunas manchas blancas, mientras que las alas, cortas y redondeadas, son de un tono marrón rojizo. El pico, de forma ganchuda, es de color marfil y sobre los ojos aparecen dos carúnculas de color rojo intenso (Figura 2g). Las hembras, en cambio, poseen un plumaje de color pardo-rojizo con bandas negras y moteado de blanco.

Son animales sedentarios, solitarios y territoriales. En la época de celo (de marzo a junio), los urogallos machos se concentran en determinados rodales forestales, conocidos como cantaderos, donde acuden fielmente todos los años para atraer y cubrir a las hembras. Tras aparearse, las hembras realizan una puesta de seis o siete huevos, en un nido construido en el suelo. Los polluelos, nidífugos, nacen tras veintisiete días de incubación y se hacen independientes entre las ocho y catorce semanas.

En la actualidad se reconocen doce subespecies, dos de las cuales habitan en la península Ibérica y se encuentran geográficamente aisladas del resto: *Tetrao urogallus aquitanicus*, distribuido a lo largo de los Pirineos incluyendo territorio de España, Francia y Andorra, y *Tetrao urogallus cantabricus*, que se distribuye en la cordillera Cantábrica. La tendencia poblacional del urogallo es claramente regresiva en España, aunque de forma mucho más acusada en la cordillera Cantábrica. Ambas subespecies están incluidas en el Catálogo Español de Especies Amenazadas, regulado por el Real Decreto 139/2011, de 4 de febrero de 2011 (BOE, de 23 febrero de 2011), y cuentan con diversas estrategias nacionales para su conservación. En dicho Catálogo Nacional se distingue actualmente entre la situación de la subespecie cantábrica, catalogada como “en peligro de extinción” y la de la subespecie pirenaica que se incluye en la categoría de “vulnerable”. Asimismo, su caza y comercialización están rigurosamente prohibidas en todo el territorio español desde el año 1980 (Robles y col., 2006).

A escala mundial, el urogallo no puede considerarse una especie globalmente amenazada, aunque las poblaciones del centro y sur de Europa están severamente fragmentadas debido a extinciones locales continuadas a lo largo de las últimas décadas. Su grado de protección en Europa, contemplado en la Directiva 2009/147/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 30 de noviembre de 2009, relativa a la conservación de las aves silvestres (DOUE, de 26 de enero de 2010),

varía según el país, estando protegido en algunos países como Grecia, Bélgica y Dinamarca, mientras que en otros como Francia, Italia, Reino Unido o Alemania está permitida su caza.

## **II.2. CARNE Y PRODUCTOS CÁRNICOS PROCEDENTES DE AVES DE CAZA Y DE LA AVICULTURA ALTERNATIVA**

El incremento en la producción de aves de caza y de otras especies de aves no cinegéticas ha provocado un aumento en el consumo de la carne y los productos cárnicos procedentes de las mismas. El creciente interés por este tipo de carnes puede deberse a la necesidad de diversificar la oferta una vez que parece alcanzado el techo máximo en el consumo de aves convencionales, principalmente pollo y pavo, y como respuesta al posible cansancio del consumidor, sin olvidar otros factores como la creciente preocupación por mantener una dieta sana con un menor contenido en grasas, así como la innegable superioridad organoléptica de estas carnes por las que el consumidor está dispuesto a pagar un mayor precio, ofreciendo al sector avícola de carne nuevas oportunidades.

La composición nutritiva de la carne procedente de aves de caza y de la avicultura alternativa es muy variable dependiendo de factores como la especie, edad, sexo, origen y tipo de alimentación de los animales. No obstante, posee una serie de características comunes que la diferencian de la carne procedente de especies de abasto de consumo habitual: a) contiene menos grasa intramuscular, con una mayor proporción de ácidos grasos



insaturados, sobre todo en los animales más jóvenes. La carne de ejemplares silvestres y migratorios tiene aún menos grasa que los que se crían en granjas debido a la energía que gastan en sus desplazamientos; b) presenta un mayor porcentaje de proteínas de alto valor biológico (*Figura 3*) y c) es rica en hierro y fósforo, conteniendo además importantes cantidades de magnesio y potasio. Asimismo, conviene destacar que las carnes de ejemplares silvestres, debido a su origen, carecen de residuos hormonales, antibióticos y otros fármacos que se utilizan con mayor frecuencia en los animales criados en granjas (Zomborszky y col., 1996; Hoffman y Wiklund, 2006).

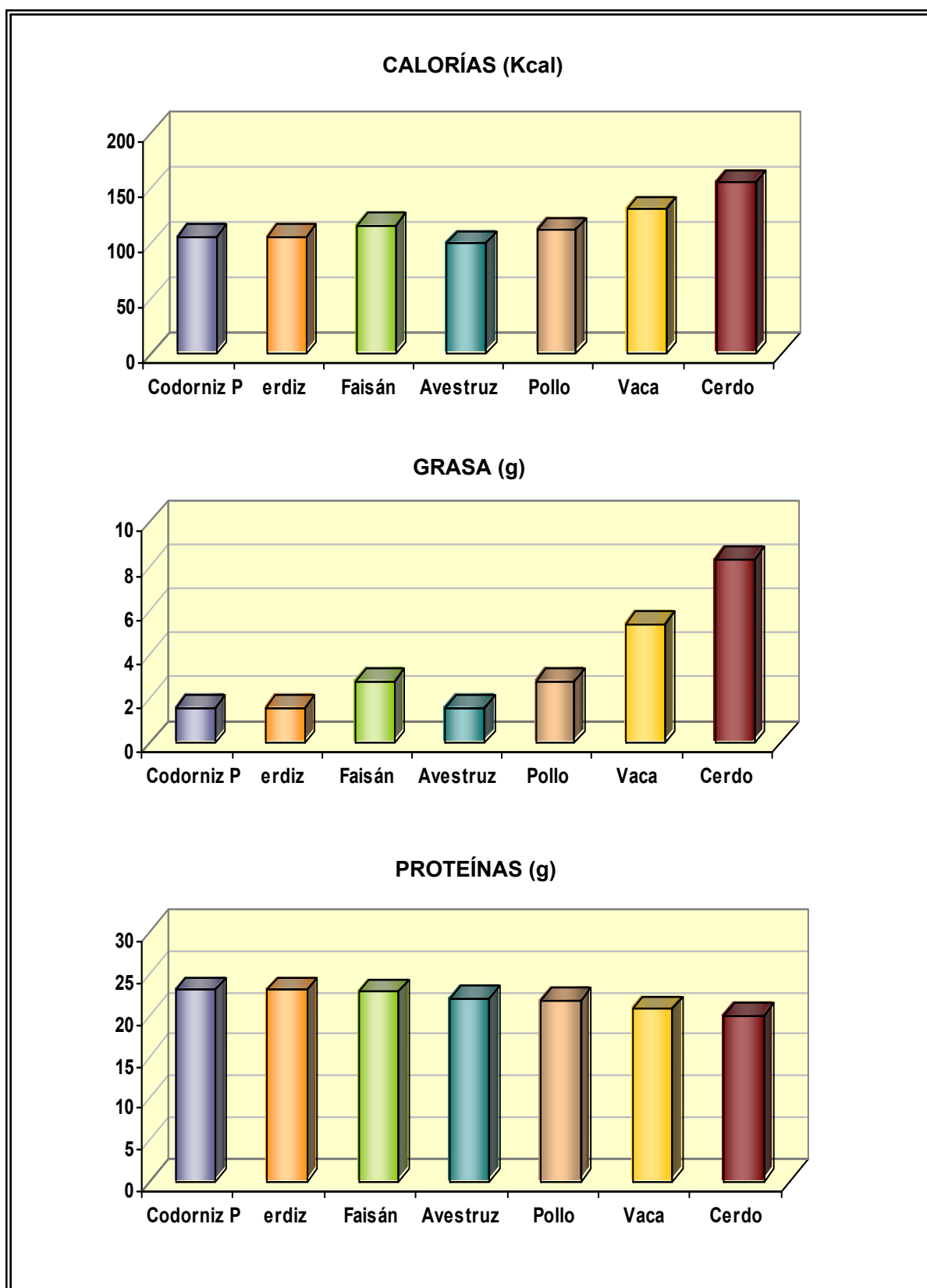
La carne de las aves de caza presenta, por lo general, un color rojo más oscuro que la carne procedente de especies domésticas, así como un olor y sabor más pronunciados. En cuanto a la textura, es habitualmente menos tierna que la de los animales domésticos, aumentando su dureza con la edad del animal. La crianza de las aves de caza en granjas cinegéticas permite obtener un producto más homogéneo y de textura más tierna. Sin embargo, el sabor de su carne es menos intenso debido a la alimentación controlada que reciben los animales (Aidoo y Haworth, 1995).

De todas las carnes de aves de caza, la más valorada en España es, sin duda, la de perdiz, especialmente la procedente de ejemplares silvestres de perdiz roja. Su carne es seca y de aroma y sabor delicado. En cuanto al faisán, la carne de la hembra es sabrosa y tierna, de color ligeramente

amarillento mientras que la carne del macho es de textura más seca y color más blanco. La codorniz, por su parte, posee una carne muy tierna y jugosa, de textura fina y agradable. La mayoría de las codornices que se consumen en España provienen de las granjas de producción, quedando en un lugar secundario los ejemplares de codorniz obtenidos en caza menor.

Las carnes procedentes de paloma son carnes de color rojo intenso, muy prietas y duras. La especie más consumida es la paloma bravía, especialmente los ejemplares criados en palomares industriales, aunque la más valorada por los cazadores y por los consumidores es la paloma torcaz. La becada y el zorzal común se consumen considerablemente menos, pero no por ello son menos apreciados. En concreto, la becada es el manjar de caza con mayor fama entre los *gourmets* debido a la finura y el exquisito sabor de su carne.

Respecto a la carne de pintada, presenta una textura y sabor similares a la carne de faisán. La carne de avestruz, en cambio, es muy similar a la de vacuno aunque presenta una coloración más oscura, menor contenido en grasa y es notablemente más tierna. El despiece de la carne de avestruz presenta distintas denominaciones y categorías comerciales. La carne extra y de primera proviene del muslo (con denominación genérica de solomillo o bistec) mientras que la carne de categoría inferior proviene del cuello y las alas, y es normalmente utilizada para la elaboración de hamburguesas y otros derivados cárnicos (Bello, 2001).



**Figura 3.** Valor nutritivo de 100 g de carne magra procedente de especies de aves de caza y de la avicultura alternativa, y especies de abasto (Mataix, 2003; Carbajo, 2006; Moreiras y col., 2009)

En la actualidad, la oferta de aves de caza y de la avicultura alternativa es relativamente amplia existiendo una gran variedad de carnes refrigeradas y congeladas a disposición del consumidor. Además, la industria cárnica ofrece una amplia gama de productos cárnicos derivados entre los que destacan escabeches, estofados, embutidos (crudos curados o cocidos), patés, hamburguesas, etc. (*Tablas 1 y 2*). De ellos, las conservas escabechadas, elaboradas principalmente a partir de carne de perdiz y codorniz, entre otros ingredientes, son los productos más demandados por el consumidor.

### **II.3. PRODUCCIÓN Y COMERCIALIZACIÓN DE AVES DE CAZA Y DE LA AVICULTURA ALTERNATIVA**

- ***Producción y comercialización de aves cinegéticas***



Según los datos recogidos en el Anuario de Estadística del Ministerio de Medio Ambiente, y Medio Rural y Marino, el número de capturas de perdiz roja permanece prácticamente estable desde el año 2000, con cerca de 3 500 000 de piezas cobradas anualmente (*Tabla 3*). Sin embargo, el número de capturas de codorniz, así como las capturas que aparecen en el epígrafe de la tabla denominado *Otra Caza Volátil*, que incluiría el resto de especies de aves de caza, ha disminuido notablemente en el periodo 2000-2008. Como se ha mencionado anteriormente, esta caída progresiva en el número de aves abatidas se debe fundamentalmente al declive poblacional que han sufrido muchas especies de aves silvestres durante las últimas décadas.

En el caso de la perdiz, el número de capturas permanece estable debido principalmente a las repoblaciones llevadas a cabo con perdices criadas en granjas cinegéticas. Hay que aclarar que los datos de capturas referentes al año 2004 no se han podido incluir en la tabla puesto que no aparecen reflejados en el Anuario de Estadística. En cuanto al epígrafe *Otra Caza Volátil*, debe destacarse que desde el año 2006 se ha procedido a su desglose por especies, recogiendo de forma más detallada los datos de capturas de algunas aves de caza como el faisán, zorzal, paloma y bécada. Entre ellas, el zorzal y la paloma son las especies que presentan un mayor número de aves abatidas superando en ambos casos las capturas de codorniz (*Tabla 3*).























Por lo que respecta a la distribución por Comunidades Autónomas del número de capturas, según los datos más recientes recabados por el Ministerio de Medio Ambiente, y Medio Rural y Marino, las Comunidades Autónomas españolas donde se capturó un mayor número de animales y se registraron mayores ingresos durante el año 2007 fueron Castilla-La Mancha, Extremadura y Andalucía (*Figura 4*).

Las especies capturadas varían en función de cada Comunidad. Las mayores capturas de perdiz, faisán y paloma tienen lugar en Castilla-La Mancha, fundamentalmente en la provincia de Toledo, y en Andalucía. En cuanto a la codorniz, se caza principalmente en Castilla y León, sobre todo en la provincia de Burgos, y en Aragón. La Comunidad Autónoma con mayores capturas

**Tabla 1. Selección de los principales productos comerciales crudos elaborados con carne de aves de caza y de la avicultura alternativa**

Producto	Especie	Ejemplo de presentación
<b>CARNE FRESCA O CONGELADA (PIEZAS ENTERAS)</b>	Codorniz, perdiz, faisán, paloma, pintada	   
<b>CARNE FRESCA O CONGELADA (DESPIECE)</b>	Codorniz, perdiz, faisán, paloma, pintada, avestruz	   
<b>SALCHICHAS</b>	Avestruz, faisán	 
<b>HAMBURGUESA</b>	Avestruz	 
<b>SALCHICHÓN Y CHORIZO</b>	Avestruz	 

**Tabla 2.** Selección de los principales productos comerciales tratados térmicamente elaborados con carne de aves de caza y de la avicultura alternativa

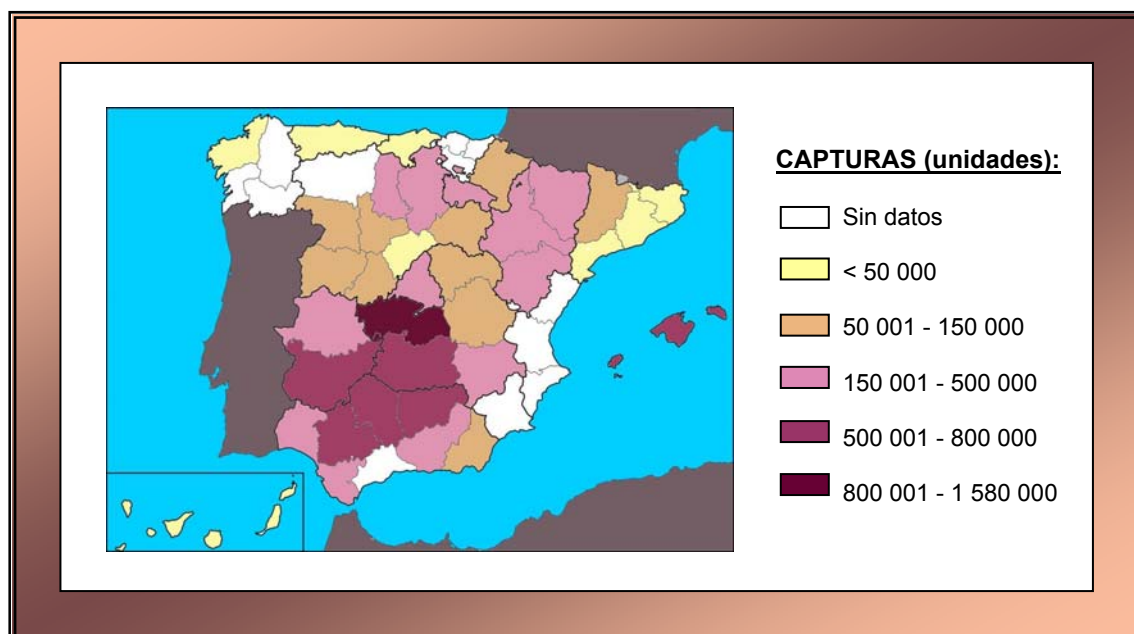
Producto	Especie	Ejemplo de presentación
<b>ESTOFADO</b>	Codorniz, perdiz, faisán, paloma, pintada, avestruz	   
<b>ESCABECHE</b>	Codorniz, perdiz, faisán, paloma, pintada	   
<b>PATÉ</b>	Codorniz, perdiz, faisán, paloma, pintada, avestruz	     
<b>CARNE AHUMADA</b>	Avestruz, faisán	 
<b>EMBUTIDOS COCIDOS</b>	Avestruz	 
<b>OTRAS CONSERVAS</b>	Codorniz, perdiz, faisán, pintada	   

**Tabla 3. Datos de capturas (número de piezas) e ingresos económicos (millones de euros) de las aves de caza**

		2000	2001	2002	2003	2005	2006	2007	2008
PERDIZ	Capturas	3 336 378	3 279 557	3 219 462	3 062 395	3 320 499	3 381 652	3 637 370	3 416 874
	Ingresos	50,1	52,6	61,4	52,9	40,9	21,9	15,3	20,5
CODORNIZ	Capturas	1 402 234	1 376 321	1 279 976	1 237 374	1 459 139	1 123 091	1 047 701	941 945
	Ingresos	3,9	3,4	2,9	5,9	1,4	2,2	1,4	1,1
OTRA CAZA VOLÁTIL	Capturas	6 751 734	7 248 054	5 817 226	5 380 601	6 817 047	1 521 751	1 448 072	1 014 475
	Ingresos	15,2	13,7	10,7	13,5	3,4	5,1	2,2	0,8
FAISÁN	Capturas	- <sup>a</sup>	-	-	-	-	252 575	50 102	865
	Ingresos	-	-	-	-	-	1,5	0,5	-
PALOMA	Capturas	-	-	-	-	-	1 379 799	1 436 950	1 288 771
	Ingresos	-	-	-	-	-	3,1	2,3	0,8
ZORZAL	Capturas	-	-	-	-	-	2 354 914	2 736 786	2 642 698
	Ingresos	-	-	-	-	-	3,2	2,7	1,9
BECADA	Capturas	-	-	-	-	-	-	44 759	33 340
	Ingresos	-	-	-	-	-	-	0,1	0,1
TOTAL CAPTURAS AVES DE CAZA		11 490 346	11 903 932	10 316 664	9 680 370	11 596 685	10 013 782	10 401 740	9 338 968
TOTAL INGRESOS AVES DE CAZA		69	70	75	72	46	37	24	25

<sup>a</sup> Valores no disponibles

Fuente: Anuario de Estadística (MARM, 2001-2009).



**Figura 4.** Capturas de aves de caza registradas en España durante en año 2007.

Fuente: *Anuario de Estadística (MARM, 2008)*

**Tabla 4.** Producción de aves en granjas cinegéticas para repoblación (nº de animales)

ESPECIE	2006	2007	2008
PERDIZ	1 192 277	948 993	789 055
CODORNIZ	568 700	516 900	204 900
FAISÁN	95 824	69 818	57 700
PALOMA	- <sup>a</sup>	10 465	1000
<b>TOTAL AVES DE CAZA</b>	<b>1 856 801</b>	<b>1 546 176</b>	<b>1 056 655</b>

<sup>a</sup> Valores no disponibles

Fuente: *Anuario de Estadística (MARM, 2007, 2008, 2009).*

**Tabla 5.** Seltas de especies de aves cinegéticas (nº de animales)

ESPECIE	2006	2007	2008
PERDIZ	1 763 915	1 374 407	1 954 209
CODORNIZ	157 117	107 821	76 940
FAISÁN	313 682	102 964	114 770
PALOMA	665 000	16 029	7 897
<b>TOTAL AVES DE CAZA</b>	<b>2 899 714</b>	<b>1 601 221</b>	<b>2 153 816</b>

Fuente: *Anuario de Estadística (MARM, 2007-2009).*

de becada es Cataluña seguida de Baleares y Castilla y León, mientras la caza del zorzal tiene lugar mayoritariamente en Andalucía, Valencia y Cataluña (Garrido, 2010).

Desde el año 2006, el Anuario de Estadística del Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino también recoge información sobre la producción de perdiz roja, codorniz, faisán y paloma en granjas cinegéticas para repoblación así como del número de sueltas realizadas por la administración u otros organismos (*Tablas 4 y 5*). Sin embargo, esta información es escasa y poco concreta puesto que sólo refleja los datos suministrados por aproximadamente un 30-50 % de las provincias españolas. Como muestra la *Tabla 4*, la especie que presenta una mayor producción en granjas cinegéticas para repoblación es la perdiz roja, seguida de la codorniz y el faisán.

- ***Producción y comercialización de aves en granjas de avicultura alternativa***

En comparación con otros sectores productivos, el sector de la carne de aves procedentes de la avicultura alternativa se caracteriza por la escasez de datos concretos y contrastados sobre producción y comercialización. No obstante, en el año 2005, el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación hizo público un estudio de caracterización de la avicultura de carne alternativa en España en el que se recogían datos interesantes sobre algunas especies como la codorniz, perdiz, faisán, paloma, pintada y avestruz (MAPA, 2005).

***Producción de carne de codorniz***

La crianza y explotación de la codorniz o “coturnicultura” comenzó a finales del siglo XIX en Japón, desde donde se extendió en primer lugar hacia otros países asiáticos y posteriormente a casi todo el mundo. Actualmente la producción de carne de codorniz se concentra fundamentalmente en determinados países de Europa, entre los que destacan Francia y España, en Estados Unidos y más recientemente en algunos países sudamericanos como Brasil. En los países asiáticos, la producción está principalmente orientada hacia la obtención de huevos (Lázaro y col., 2005).

En España, existen actualmente 601 granjas de codornices, concentradas en las Comunidades Autónomas de Extremadura (156 granjas), Andalucía (149) y Cataluña (99) (MARM, 2011). Aproximadamente un 70 % de estas explotaciones están orientadas hacia la producción de carne mientras que el 30 % restante se dedica a la producción de codornices para repoblación (Sánchez y col., 2009). La subespecie más utilizada para la producción de carne es la codorniz japonesa (*Coturnix coturnix japonica*) mientras que para repoblación de cotos se emplea la codorniz europea (*Coturnix coturnix coturnix*). No obstante, la codorniz japonesa es también objeto de sueltas en cotos de caza lo que ha dado lugar a la formación de híbridos entre esta subespecie y la codorniz europea. Esta contaminación genética supone un grave riesgo para las poblaciones de codorniz europea, puesto que la ausencia de instinto migratorio de la codorniz japonesa favorece la sedentarización de las poblaciones migratorias en África, disminuyendo por



tanto su presencia en Europa (Puigcerver y col., 2001).

La producción de carne de codorniz en España es bastante elevada en comparación con la de otras aves alternativas. Según los datos recogidos en el estudio de caracterización de la avicultura de carne alternativa en España (MAPA, 2005) en el año 2004 se produjeron aproximadamente 9300 toneladas de carne de codorniz, lo que supone el 11 % del total de carne de la avicultura alternativa. En relación al comercio exterior, España es uno de los principales países exportadores de carne de codorniz en Europa, con unas 2282 toneladas en el 2003 y 1395 toneladas en el 2004, siendo Francia el principal receptor. El consumo de este tipo de carne es bastante elevado (250 g *per capita* en el año 2004) y tiene lugar durante todo el año, aunque durante el periodo navideño se produce un aumento significativo de la demanda (MAPA, 2005).

### ***Producción de carne de perdiz***

La cría de perdices en granjas comenzó a desarrollarse a mediados del siglo pasado y hoy en día es una actividad muy extendida, sobre todo en Estados Unidos y diversos países de Europa. Las especies empleadas varían de unas regiones a otras. En Estados Unidos es frecuente la cría de ejemplares de perdiz chukar (*Alectoris chukar*) y perdiz pardilla (*Perdix perdix*), mientras que en Europa, además de éstas, se crían otras especies como la perdiz griega (*Alectoris graeca*), perdiz moruna (*Alectoris barbara*) y perdiz roja (*Alectoris rufa*). La mayoría de las

granjas de perdiz existentes en el mundo están destinadas a la repoblación de cotos de caza.

En nuestro país, la cría de perdices comenzó a principios de los años sesenta con la producción de perdices rojas para repoblación. Posteriormente, puesto que la temporalidad en la producción cinegética de perdiz roja imponía una estacionalidad en el consumo de su carne, comenzaron a desarrollarse nuevos métodos de cría intensiva para poder extender el consumo de perdices durante todo el año. Sin embargo, la escasa capacidad productiva de la perdiz roja dio lugar a la búsqueda de otras especies que permitiesen obtener un mayor rendimiento productivo. Como consecuencia de ello, las granjas de producción para carne comenzaron a criar ejemplares de la especie alóctona perdiz chukar. En la actualidad, la perdiz chukar sigue siendo la principal especie empleada en las granjas de producción intensiva de carne, mientras que la cría en granjas de perdiz roja se lleva a cabo principalmente con fines cinegéticos (MAPA, 2005). La perdiz moruna y la perdiz pardilla se crían también hoy en día con fines cinegéticos aunque en menor medida.

La producción de perdices de carne ha experimentado un notable incremento en los últimos veinte años. En el año 2003 se produjeron aproximadamente 470 t de carne en canal, lo que equivale al sacrificio de 1 600 000 aves (MAPA, 2005). El número de granjas en el territorio nacional es muy elevado situándose incluso por encima de las granjas dedicadas a la producción de pavos. En enero de 2011 había registradas

en el Registro General de Explotaciones Ganaderas un total de 1027 granjas concentradas en las Comunidades Autónomas de Andalucía (280 granjas), Extremadura (270), Castilla-La Mancha (105), Cataluña (103) y Castilla y León (97) (MARM, 2011). No obstante, aproximadamente un 70 % de estas granjas están destinadas a la producción de perdices para repoblación (Sánchez y col., 2009).

Una práctica que se realiza con cierta frecuencia en los sistemas de producción de perdiz roja, es el cruzamiento intencionado de ejemplares de esta especie con individuos de perdiz chukar con el fin de conseguir una mejor adaptación a la cautividad y una mayor potencialidad reproductiva. Esta práctica está permitida en aquellas granjas que producen perdices rojas para carne, estando estrictamente prohibida en las explotaciones que producen perdices con fines cinegéticos puesto que sólo pueden ser liberados en el campo ejemplares puros de perdiz roja (Ley 42/2007, de 13 de diciembre de 2007, del Patrimonio Natural y de la Biodiversidad (BOE, de 14 de diciembre de 2007)). No obstante, a pesar de estas prohibiciones, las sueltas y repoblaciones fraudulentas con híbridos resultantes de cruces entre ejemplares de perdiz roja y perdiz chukar han constituido un serio problema en este sector, que actualmente persiste aunque en mucho menor grado (Tejedor y col., 2006).

### ***Producción de carne de faisán***

El faisán es una de las aves de caza que más desarrollo industrial ha tenido a nivel mundial en los últimos años. La mayor

parte de la producción se concentra en Estados Unidos, Canadá y Europa, fundamentalmente en Inglaterra, Francia e Italia, y tiene como objetivo principal la obtención de animales vivos para repoblación de cotos de caza, siendo su producción para carne de tipo secundario. Asimismo, en los últimos años, al igual que ocurre con la codorniz, ciertos países sudamericanos como Argentina han encontrado en sus condiciones climáticas y ambientales las características ideales para la cría de faisanes. Además, debido a la estacionalidad en la cría del faisán, la época de mayor producción en estos países coincide con la de escasez en el continente europeo, lo cual favorece las exportaciones a Europa (Santa Cruz y col., 2006).

En España, el faisán comenzó a criarse en los años sesenta con fines cinegéticos. En la actualidad, de las 475 granjas productoras de faisán presentes en el territorio nacional, un 50 % están orientadas a la producción cárnica mientras que el 50 % restante cría faisanes para repoblación. Esta producción se concentra sobre todo en Extremadura (130 granjas), Andalucía (96), Castilla y León (70) y Cataluña (39) (Sánchez y col., 2009; MARM, 2011). A pesar de la existencia de algunas granjas con reproductores, fundamentalmente destinadas a la producción de animales para repoblación de cotos de caza, la mayor parte de las granjas productoras de carne importan los faisanes de un día de granjas de producción extranjeras, principalmente francesas (Castelló, 2005).

Con relación a los volúmenes de

producción, los últimos datos disponibles son los publicados en el año 2004 por el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, en los que se estimaba una producción total de 44 t de carne para el año 2003 (MAPA, 2005). El consumo es escaso en comparación con otras especies como la codorniz y la perdiz, y se concentra fundamentalmente en el periodo navideño (MAPA, 2005).

### ***Producción de carne de pintada***

Criada en cautividad desde la época griega y romana, el desarrollo de la cría de esta especie en granjas para la producción de carne tuvo lugar a mediados del siglo pasado en Europa. En la actualidad, el principal país productor, exportador y consumidor de carne de pintada es Francia que, con cerca de 40 000 t de carne al año, acapara tres cuartas partes de la producción en Europa y dos tercios de la producción mundial. Otros países europeos con producciones importantes son Italia y Bélgica (Mead, 2004). Fuera de Europa, destacan Estados Unidos, Canadá y Australia (Saina, 2005; Fajemilehin, 2010).

Por lo que respecta a España, es una carne poco conocida entre los consumidores, con una demanda baja, exceptuando el periodo navideño en el que se incrementa notablemente la demanda. La producción nacional es relativamente escasa, estimándose en 140 t de carne anuales (MAPA, 2005). La mayor parte de la carne que se consume procede de importaciones, fundamentalmente de Francia e Italia, las cuales han aumentado en los últimos años alcanzando las 854 t en el año 2009. Aún así,

desde el año 2005 ha habido un incremento importante en el número de granjas dedicadas a la producción de esta especie. En la actualidad existen 154 explotaciones, localizadas principalmente en Andalucía (55 granjas), Baleares (22), Cataluña (16) y Extremadura (14) (MARM, 2011). Sin embargo, no existe ninguna granja de selección de pintadas que disponga de una base genética de la que puedan abastecerse los criadores para disponer de pintadones recién nacidos, por lo que todos los pintadones requeridos para la producción tienen que ser importados de Francia, país que ostenta el liderazgo en torno a la mejora genética de estas aves. La única excepción es una explotación en régimen semi-extensivo que ha promovido en Badajoz, desde 1997, el Servicio de Investigación y Desarrollo Tecnológico de la Junta de Extremadura, con el fin de luchar contra la plaga de langosta mediante la utilización de la pintada como depredador. Con posterioridad a esta finalidad inicial, han seguido criando estas aves para producción de carne a partir de una línea genética propia (Castelló, 2005).

### ***Producción de carne de paloma***

La producción de palomas se centra principalmente en la obtención de pichones para carne a partir de distintas razas de la variedad doméstica (*Columba livia* var. *domestica*). La paloma zurita se cría en menor medida para la práctica del tiro al pichón. Con respecto a la paloma torcaz, no se tiene constancia de su cría en palomares industriales.

Los principales países productores

de carne de pichón son Estados Unidos, Francia, Italia y, en menor grado, España. Las razas empleadas son muy variadas (*King, Texan, Hubbel, Carneau*, etc.), siendo el híbrido sintético *Europigeon* desarrollado en Francia, el más utilizado por la mayor parte de los criadores en los países europeos, incluida España. La cría intensiva de palomas se caracteriza por la dependencia total de los pichones de los padres, que los crían y alimentan hasta que abandonan el nido, momento en el que se sacrifican (MAPA, 2005).

En cuanto a la producción en el territorio nacional, la primera granja industrial de pichones se creó en Navarra en el año 1994 obteniéndose ya en aquel año cerca de 1500 kg de carne de pichones. El sector experimentó un rápido crecimiento con la aparición de nuevas granjas en la zona que, en el año 2000, llegaron a producir 29 000 kg de carne (Castelló, 2005). Los últimos datos publicados por el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación estimaron la producción en 47 200 kg para el año 2004. Hoy en día existen en España 787 granjas dedicadas a la producción intensiva de palomas, localizadas en su mayoría en Castilla y León (206 granjas), Extremadura (117) y Andalucía (108). Una excepción al sistema de explotación intensivo es la crianza en libertad que se lleva a cabo en Tierra de Campos, en la Comunidad Autónoma de Castilla y León, donde se han rehabilitado antiguos palomares en los que anidan palomas bravías y zuritas. La producción en estos palomares es más estacional, teniendo un descanso invernal. Los pichones obtenidos son bastante

menores que los producidos en el resto de granjas y se comercializan principalmente en zonas de Castilla y León (Castelló, 2005).

### ***Producción de carne de avestruz***

La cría de avestruces en granjas se originó a mediados del siglo XIX en Sudáfrica, que instauró una política comercial basada en el monopolio de la comercialización de los productos del avestruz y en las restricciones en la exportación de reproductores. Aunque en sus inicios la explotación se centró en la obtención de plumas, fuertemente demandadas por la sociedad europea y americana de la época, la sucesión de varias crisis en el sector de la pluma, provocó que a mediados del siglo XX la producción se diversificase hacia la obtención de piel y carne (Buxadé, 1999). No obstante, no fue hasta los años ochenta cuando surgió el auténtico desarrollo en el sector de la carne de avestruz. Este desarrollo en el sector cárnico propició el inicio de la actividad pecuaria ligada al avestruz en Europa, fundamentalmente en Alemania, Bélgica y Holanda (Carbajo y col., 1997).

En la actualidad, el país líder en cuanto a la explotación del avestruz sigue siendo Sudáfrica, con el 70 % de la producción mundial, sobre todo la zona de Oudshoorn, donde se concentra el 60 % de la actividad ganadera. Otros países con una producción significativa de avestruces son Estados Unidos, Israel, Canadá y diversos países africanos como Zimbabwe, Namibia y Bostwana. Un nuevo frente de comercialización ha surgido más recientemente en América Central y del Sur, especialmente en

Brasil, Chile y México, así como en diversos países de Asia y Oriente Medio. En Europa, el número de granjas y la población de avestruces están en crecimiento, siendo esta tendencia mayor en países de Europa del Este y del Centro (Bello, 2001; Carbajo, 2005).

En España, la instalación de la primera granja de avestruces tuvo lugar en Madrid en el año 1993. La producción tuvo un gran crecimiento entre los años 1997 y 2000, para acabar con la desaparición de aproximadamente el 90 % de las granjas entre 2001 y 2003 (MAPA, 2005). Hoy en día, la producción parece haberse estabilizado existiendo un total de 347 explotaciones, distribuidas principalmente en Andalucía (74), Cataluña (53) y Castilla y León (39) (MARM, 2011). Según estimaciones del sector productor, la producción de carne se sitúa en torno a 180 000 kg anuales, correspondientes al sacrificio de unas 7000 aves (MAPA, 2005)

- ***Situación del mercado de la carne de aves de caza y de la avicultura alternativa y perspectivas futuras***

Según datos disponibles en el Ministerio de Medio Ambiente, y Medio Rural y Marino, la carne y productos cárnicos se sitúan entre los grupos de alimentos de mayor consumo en España, representando un 20,74 % del gasto total en alimentación en el año 2010 (18 267 millones de euros). De acuerdo a esta misma fuente, el consumo de carne en nuestro país se ha mantenido estable en los últimos años registrados en el Libro de la Alimentación Española (1990-2008), con valores que se

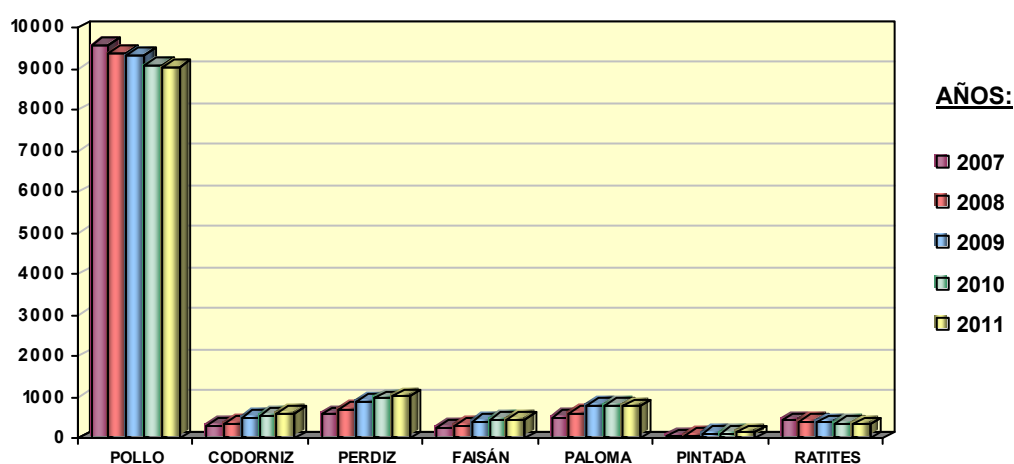
acercan a los 64 kg por persona y año (*Tabla 6*). Cabe mencionar que, a pesar del descenso sufrido en 2008, el consumo de carnes de especies de aves de caza y de la avicultura alternativa, incluido en el apartado *Otras carnes*, es cada vez más importante. Por otra parte, la cría de aves para la producción de carne es, en la actualidad, una de las ganaderías más importantes de nuestro país. Este sector ha experimentado un importante crecimiento en los últimos años debido, en parte, al desarrollo de la avicultura alternativa. En este sentido, desde el año 2007 se ha producido un aumento en el número de explotaciones dedicadas a la producción de especies alternativas, mientras que las granjas dedicadas a la producción de pollo han disminuido (*Figura 5*). La única excepción a esta tendencia han sido las explotaciones productoras de avestruz que han experimentado un descenso en los últimos años. El incremento en la producción de especies alternativas hace prever una mayor oferta y demanda de carne y productos cárnicos procedentes de las mismas.

En el año 2010 se constituyó la Asociación Interprofesional de la Carne de Caza Silvestre (ASICCAZA), que agrupa a diversas organizaciones del ámbito cinegético entre las que se incluyen la Real Federación Española de Caza, la Asociación de Propietarios Rurales para la Gestión Cinegética y Conservación del Medio Ambiente de España, y las Asociaciones de Salas de Despiece y Tratamiento de Caza de Castilla y León, Extremadura y Andalucía, entre otras. Entre los objetivos prioritarios de esta organización se encuentra la mejora

**Tabla 6. Evolución del consumo de carne en España (kg/persona/año)**

ESPECIE	1990	1995	2000	2005	2008
<b>CARNES FRESCAS</b>	47,8	44,6	48,6	49,1	42,7
POLLO	17,79	16,2	16,7	16,1	15,1
CERDO	9,4	8,6	13,3	13,5	13,6
VACUNO	9,6	10,0	9,8	10,2	9,1
OVINO Y CAPRINO	3,8	3,5	3,4	3,2	3,1
OTRAS CARNES	3,7	4,5	4,3	4,8	1,8
<b>CARNES TRANSFORMADAS</b>	16,9	15,7	15,8	14,9	8,08
<b>CARNES CONGELADAS</b>	1,9	0,9	1,2	1,8	13,14
<b>TOTAL CARNES</b>	<b>66,2</b>	<b>61,2</b>	<b>65,5</b>	<b>65,9</b>	<b>64,02</b>

Fuente: *Libro de la Alimentación en España (MARM, 2003, 2005). Fichas de consumo (MARM, 2008)*



ESPECIE	2007	2008	2009	2010	2011
POLLO	9585	9376	9340	9098	9026
CODORNIZ	314	378	530	565	601
PERDIZ	591	705	919	978	1025
FAISÁN	267	327	424	463	475
PALOMA	535	629	801	818	787
PINTADA	56	72	119	134	154
RATITES	449	412	390	356	347

**Figura 5.** Evolución del número de explotaciones por especies avícolas en España (años 2007-2011).

Fuente: *El Sector de la carne de aves en cifras (MARM, 2011)*

de la calidad de los productos y de todos los procesos que intervienen en la cadena agroalimentaria. Asimismo, en el año 2009 se creó la primera marca de calidad para la carne de caza, “Calidaz”, nacida para dar a conocer este producto a los consumidores y ofrecerlo con las máximas garantías higiénico-sanitarias. La marca “Calidaz” facilitará la apertura de nuevos canales de comercialización y la promoción del mercado nacional.

#### **II.4. TÉCNICAS APLICADAS A LA IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES DE AVES DE CAZA Y DE LA AVICULTURA ALTERNATIVA EN CARNES Y PRODUCTOS CÁRNICOS**

Las carnes y productos cárnicos procedentes de especies de aves de caza y de la avicultura alternativa son a menudo objeto de un etiquetado fraudulento, debido al beneficio que se obtiene al vender las especies más valoradas por otras de precio inferior. Los consumidores tienen el derecho a demandar que las carnes y los productos cárnicos frescos y transformados que se comercializan correspondan a las especies animales que aparecen en el etiquetado. Por otra parte, la administración debe controlar la autenticidad de los productos expuestos a la venta, y las propias industrias tienen que exigir a sus proveedores certificados de autenticidad de las materias que adquieren. Garantizar la autenticidad de una materia prima o de un producto transformado es esencial cuando se quieren implantar sistemas de trazabilidad. Por ello, la puesta a punto de métodos de análisis eficaces, rápidos y baratos que permitan identificar la

especie animal de procedencia en estos productos, permitiría prevenir posibles fraudes y ofrecer una mayor protección a las industrias de transformación, empresas de importación y exportación, y consumidores (Pascal y Mahé, 2001; Teletchea y col., 2005).

Las técnicas utilizadas en la identificación de especies animales en los alimentos se pueden dividir en dos grandes grupos: aquellas basadas en el análisis de proteínas y las que se centran en el análisis del ADN o técnicas genéticas. Si bien los métodos basados en el análisis de proteínas han sido los más utilizados, los grandes avances que han tenido lugar en los últimos años en las técnicas de biología molecular, han impulsado el rápido desarrollo de numerosas técnicas genéticas que se han aplicado con éxito a la identificación de especies animales en los alimentos.

##### **II.4.1. TÉCNICAS BASADAS EN EL ANÁLISIS DE PROTEÍNAS**

Los métodos basados en el análisis de proteínas que se utilizan para la identificación de especies animales incluyen distintas técnicas electroforéticas, la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), las técnicas espectrométricas y las técnicas inmunológicas.

###### **II.4.1.1. Técnicas electroforéticas**

La electroforesis es un procedimiento analítico basado en la separación de moléculas cargadas en un medio acuoso, bajo la influencia de un campo eléctrico aplicado entre dos electrodos, uno positivo y otro negativo. El movimiento de las proteínas

dependerá de su tamaño y de la carga neta que presenten en el pH del tampón seleccionado para el análisis. Las moléculas que tengan una carga neta mayor, tenderán a moverse más rápidamente que aquellas con menor carga neta. En el caso de que esta sea igual, las moléculas menores se desplazarán con mayor rapidez.

La identificación de especies se realiza comparando el perfil electroforético obtenido a partir de las proteínas musculares de las muestras problema, con los patrones de bandas de muestras de referencia. La comparación puede ser visual, o bien utilizando un densitómetro o un analizador de imágenes. Habitualmente, para comparar los patrones de bandas es necesario analizar las muestras de referencia en el mismo gel que las desconocidas, ya que pequeños cambios en las condiciones experimentales pueden alterar los perfiles proteicos obtenidos (Vallejo y col., 2005).

Para la identificación de especies animales en carne y productos cárnicos se pueden utilizar diversas técnicas electroforéticas, dependiendo del grado de resolución que se desee obtener, así como del tipo de tratamiento que haya experimentado el producto durante el procesado. Las más utilizadas son la electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE), el isoelectroenfoque (IEF) y más recientemente la electroforesis capilar (CE). Los principales inconvenientes de la técnica de SDS-PAGE y el isoelectroenfoque derivan de la complejidad de los perfiles proteicos obtenidos y de la necesidad de

disponer de personal entrenado e instrumental especializado para realizar los análisis. La electroforesis capilar, en cambio, permite detectar y cuantificar simultáneamente diferentes moléculas realizando un análisis completamente automatizado de proteínas sin necesidad de operarios especializados. No obstante, su principal limitación reside en la necesidad de poner a punto sistemas de detección adecuados para cada compuesto que, además, han de ser muy sensibles debido a los pequeños volúmenes que se utilizan.

Las técnicas electroforéticas se han utilizado ampliamente en la identificación de numerosas especies animales en los alimentos (Savage y col., 1995; Cota-Rivas y Vallejo-Córdoba, 1997; Renon y col., 2003; Rahman y col., 2007). Sin embargo, su empleo para la identificación de carnes de aves de caza y de la avicultura alternativa ha sido muy escaso, existiendo únicamente algunos estudios para la detección de avestruz.

Hofmann (1997) consiguió identificar mediante isoelectroenfoque en geles de poliacrilamida (PAGIF), patrones de bandas especie-específicos de la mioglobina en carne cruda de avestruz, pollo, pato, camello, corzo, vaca, oveja, cerdo, caballo, liebre y conejo. No obstante, no se comprobó la aplicabilidad de la técnica para el análisis de carnes tratadas térmicamente.

Vallejo-Córdoba y col. (2010) llevaron a cabo la diferenciación de carnes de avestruz y vaca, mediante el análisis por electroforesis capilar con SDS (SDS-CE) de las proteínas solubles en agua (WSP) y las



proteínas solubles en disoluciones salinas (SSP) del músculo. La comparación de los perfiles generados a partir de las proteínas solubles en agua mostró diferencias cuantitativas y cualitativas que permitieron diferenciar la carne de las dos especies. Sin embargo, al igual que en el trabajo publicado por Hofmann (1997), sólo se analizaron muestras de carne cruda, no evaluándose la aplicabilidad de la técnica para el análisis de carnes sometidas a tratamiento térmico.

#### **II.4.1.2. Técnicas cromatográficas: cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)**

Las técnicas cromatográficas también se han aplicado a la identificación de especies animales en productos cárnicos. Entre ellas, la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, *High Performance Liquid Chromatography*) utilizando columnas de fase reversa (RP-HPLC) es la más utilizada. Esta técnica permite la separación de las proteínas atendiendo a su polaridad, es decir, a su distribución entre una fase móvil polar y una fase orgánica que está fija a una matriz (San Miguel y col., 2010). De este modo se obtienen perfiles cromatográficos de proteínas característicos de cada especie, que permiten su identificación mediante comparación con cromatogramas de referencia.

La técnica de HPLC presenta ventajas importantes frente a las técnicas electroforéticas: es un método rápido y sencillo, tiene gran poder de resolución y no emplea reactivos tóxicos. Además, dada su gran reproducibilidad, una vez obtenidos los cromatogramas no es necesario el análisis conjunto de muestras de referencia. El uso

de esta técnica es especialmente interesante desde el punto de vista de la cuantificación, ya que los sistemas de detección (generalmente con luz UV) permiten estimar la cantidad de proteína perteneciente a una especie presente en una mezcla. Sin embargo, el gran inconveniente de las técnicas de HPLC es la dificultad para la identificación de muestras sometidas a tratamientos térmicos intensos, ya que las proteínas, una vez desnaturalizadas por el calor, no son solubles en los tampones de elución (Toorop y col., 1997).

En general, la técnica de HPLC ha sido muy utilizada para la identificación de especies animales en alimentos (Abe y Okuma, 1995; Espinoza y col., 1996; Piñeiro y col., 1997; Gil-Agustí y col., 2008). No obstante, al igual que en el caso de las técnicas electroforéticas, son escasos los ensayos publicados para la identificación de especies de aves de caza y de la avicultura alternativa.

Chou y col. (2007) desarrollaron una técnica de cromatografía líquida de alta resolución con detección electroquímica (HPLC-EC) para identificar carnes de quince especies animales, entre las que se incluía el avestruz. Estos autores consiguieron obtener perfiles proteicos especie-específicos para todas las especies analizadas independientemente de la zona de origen de la muestra cárnica (pechuga, muslo, etc.). Además, comprobaron que la técnica se podía aplicar con éxito para la identificación de las especies diana en carnes cocinadas a 100 °C durante 5 min y en mezclas cárnicas.

Hung y col. (2011) diferenciaron

carne cruda de avestruz, pollo, cerdo y vaca mediante el análisis por HPLC con detección electroquímica (HPLC-EC) de aminoácidos y dipéptidos de histidina. El análisis de la proporción de lisina, anserina, carnosina y glutamina presente en las muestras permitió la diferenciación entre la carne de avestruz (bajo porcentaje de carnosina) y la carne del resto de especies analizadas (elevado porcentaje de carnosina). Estos autores estudiaron también los cambios producidos en las proporciones de lisina, anserina, carnosina y glutamina tras el almacenamiento de la carne a temperaturas de 4 o 25 °C a lo largo de nueve días. No obstante, no se verificó la utilidad de la técnica para el análisis de carnes tratadas térmicamente.

#### II.4.1.3. Técnicas espectrométricas

Los métodos espectrométricos son procedimientos instrumentales basados en la interacción de la radiación electromagnética, u otras partículas, con un analito para identificarlo o determinar su concentración. Estos métodos se pueden dividir en técnicas espectroscópicas y técnicas no espectroscópicas. Las técnicas espectroscópicas son aquellas en las que el analito sufre procesos de absorción, luminiscencia o emisión. Los métodos espectrométricos se diferencian también según la naturaleza de la excitación medida, dando lugar a la espectrometría electromagnética, de masas, de electrones, acústica, dieléctrica y mecánica. Las técnicas espectrométricas más utilizadas para la identificación de especies animales en los alimentos son la espectroscopia electromagnética infrarroja y la espectrometría de masas.

La **espectroscopia infrarroja** (espectroscopia IR) utiliza la parte infrarroja del espectro electromagnético y se clasifica según el tipo de radiación que analiza en: espectroscopia de reflectancia del infrarrojo cercano (NIR), del infrarrojo medio (MIR) y del infrarrojo lejano (FIR). Actualmente, la más empleada en el análisis de alimentos es la espectroscopia de infrarrojo cercano (NIRS, *Near Infrared Spectroscopy*), que obtiene el espectro de reflectancia de una muestra en la región de longitudes de onda comprendidas entre 780-2500 nm.

La técnica de NIRS está siendo adoptada como método analítico de elección en numerosos laboratorios debido a su rapidez, precisión y versatilidad, ya que un mismo instrumento es válido para el análisis de diferentes parámetros en distintos productos con una mínima preparación de la muestra. Asimismo, la técnica de NIRS ofrece la posibilidad de realizar análisis cuantitativos y cualitativos para identificar y caracterizar diferentes productos sin la necesidad de utilizar reactivos químicos. No obstante, el empleo de esta técnica requiere el manejo de equipos complejos que precisan análisis de calibración exhaustivos (Luykx y Van Ruth, 2008). Además de otras aplicaciones, la tecnología NIRS se emplea cada vez más para la identificación de especies animales en los alimentos (Ding y Xu, 1999; Downey y col., 2000; Núñez y De la Haba, 2007) y piensos (Pérez-Marín y col., 2004; Termes y col., 2004; Yang y col., 2008). Con relación a la identificación de especies de aves de caza y de la avicultura alternativa, se han publicado algunos trabajos que emplean la técnica de NIRS

para evaluar la composición de la carne de avestruz (Viljoen y col., 2005) y pintada (Tejerina y col., 2009). Sin embargo, hasta el momento no existen estudios que empleen este método para la diferenciación de estas especies.

La **espectrometría de masas** (MS) se basa en la posibilidad de separar especies moleculares y atómicas según su relación masa-carga. Para ello es necesario ionizar las moléculas y obtener los iones formados en fase gaseosa. Este proceso tiene lugar en una fuente de ionización y, actualmente, existen diferentes técnicas que permiten llevarlo a cabo como el Impacto Electrónico (EI), Bombardeo con Átomos Rápidos (FAB), Ionización Química a Presión Atmosférica (APCI), Desorción/Ionización por Láser Asistida por Matriz (MALDI) o Electrospray (ESI). Los iones generados son acelerados hacia un analizador y separados en función de su relación masa-carga mediante la aplicación de campos eléctricos, magnéticos o simplemente determinando el tiempo de llegada a un detector. Los iones que llegan al detector producen una señal eléctrica que es procesada, ampliada y enviada a un ordenador. El patrón de fragmentación resultante, así como los iones residuales, constituyen el espectro de masas. En principio, el espectro de masas de cada compuesto es único y puede ser utilizado para caracterizar el analito.

La espectrometría de masas ofrece numerosas ventajas frente a las técnicas espectroscópicas ya que se puede obtener mucha información con una cantidad muy

pequeña de muestra, no implica absorción o emisión de luz, presenta una mayor sensibilidad y los espectros obtenidos son más sencillos, generalmente únicos y fácilmente interpretables. En cambio, también tiene una serie de inconvenientes como el elevado coste del instrumental utilizado.

Espinoza y col. (1999) llevaron a cabo la identificación de sesenta y dos especies animales, incluyendo aves como el faisán, mamíferos y reptiles, mediante el análisis por espectrometría de masas con ionización por electrospray (ESI-MS) de la hemoglobina sanguínea. Los espectros de masas generados permitieron diferenciar las especies analizadas debido a que los pesos moleculares de las cadenas alfa y beta de la hemoglobina eran característicos para cada especie.

Buckley y col. (2008) desarrollaron una técnica de espectrometría de masas para detectar e identificar la presencia de restos óseos de faisán, pollo, pavo, pato y varias especies de mamíferos, en harinas de carne y huesos. La técnica se basaba en la digestión de la cadena alfa dos del colágeno tipo I del hueso con una collagenasa bacteriana (*Clostridium histolyticum*). El análisis posterior de la cadena alfa dos mediante espectrometría de masas con láser de desorción/ionización asistida por matriz (MALDI-MS) permitió diferenciar la especie de origen de las muestras óseas analizadas.

#### **II.4.1.4. Técnicas inmunológicas**

Las técnicas inmunológicas son procedimientos analíticos basados en la reacción específica entre un antígeno y su

correspondiente anticuerpo. La aplicación cada vez más generalizada de estas técnicas para la detección en los alimentos de constituyentes naturales, plaguicidas, microorganismos, toxinas, etc., se debe a las grandes ventajas que presentan frente a los métodos convencionales. En este sentido, la aplicación de las técnicas inmunológicas a la identificación de especies presenta importantes ventajas con respecto a las electroforéticas y de HPLC: reducción del tiempo y coste del análisis, disminución de la cantidad de muestra necesaria, utilización de instrumental poco complejo y posibilidad de semi-automatización y aplicación en pruebas de campo y kits miniaturizados. Además, su adecuada sensibilidad y especificidad las hacen especialmente útiles para el análisis rutinario de los alimentos. En lo que se refiere a la identificación de especies animales, las técnicas inmunológicas han sido ampliamente utilizadas en el análisis de productos cárnicos (Macedo-Silva y col., 2000; Rencova y col., 2000; Kotoura y col., 2009), lácteos (Moatsou y Anifantakis, 2003; Hurley y col., 2004; Song y col., 2011) y pesqueros (Asensio y col., 2008a; Faeste y Plassen, 2008; Hsieh y col., 2009).

Las técnicas de ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) constituyen en la actualidad los métodos inmunológicos más utilizados en el análisis de alimentos. Se caracterizan por el empleo de marcadores enzimáticos para la detección y amplificación de las reacciones antígeno-anticuerpo. En estas técnicas, uno de los elementos de la reacción (antígeno o anticuerpo) se fija a un soporte sólido, generalmente placas de poliestireno,

polivinilo, polipropileno o nylon, que permiten su adsorción pasiva y la eliminación de los compuestos libres mediante lavado. Una vez inmovilizados los antígenos o los anticuerpos, la interacción antígeno-anticuerpo se detecta mediante la reacción colorimétrica producida por la acción de una enzima (conjugada al antígeno o al anticuerpo) al degradar el sustrato correspondiente. La medida de la absorbancia en los pocillos de la placa de ELISA permite cuantificar la reacción inmunológica.

Las técnicas inmunoenzimáticas se han desarrollado en diversos formatos atendiendo al componente de la reacción que se fija en primer lugar, la fase sólida utilizada y si se emplean o no concentraciones limitantes de antígeno y anticuerpo. En la identificación de especies, los más utilizados son el ELISA indirecto, ELISA competitivo y ELISA sandwich (Asensio y col., 2008b).

Billett y col. (1996) utilizaron el formato de ELISA indirecto para la identificación de carne de diferentes especies de aves (faisán, pollo, pato y pavo), empleando para ello el anticuerpo monoclonal 4B4/B2 producido frente a la proteína desmina del músculo de pollo, separada previamente por SDS-PAGE. Este anticuerpo reconocía las muestras de carne de faisán, pollo, pavo y pato, pero no reaccionaba frente a la carne de vaca, cerdo y oveja, permitiendo su diferenciación. Además, permitía reconocer productos de la degradación de la desmina comprendidos entre 30 y 40 kDa, demostrando su utilidad para el análisis no sólo de muestras cárnicas crudas, sino también de

carnes tratadas térmicamente. El límite de detección alcanzado fue de un 10 % de carne de aves en mezclas cárnicas.

Chen y col. (2002) desarrollaron una técnica de ELISA indirecto empleando tres anticuerpos monoclonales obtenidos frente a la proteína termoestable troponina I, para la detección de la presencia de tejido muscular de avestruz, pollo, pavo, vaca, cerdo, oveja, ciervo y caballo (anticuerpo MAb 7F7) y la diferenciación de tejido muscular de mamíferos (anticuerpo MAb 7A12) y de rumiantes (anticuerpo MAb 7A8) en piensos. La aplicabilidad de la técnica se comprobó mediante el análisis de piensos que contenían entre un 1-50 % de harinas de carne tratadas a 132 °C y 2 bar de presión durante 2 h. El límite de detección obtenido fue del 1 % para las harinas de carne y entre el 0,3-2 % para las harinas de mamíferos y rumiantes.

#### II.4.2. TÉCNICAS GENÉTICAS

Las técnicas genéticas se basan en el reconocimiento específico de fragmentos de ácidos nucleicos presentes en los seres vivos. A pesar de resultar más costosas y exigir un mayor soporte técnico que las basadas en el análisis de proteínas, las técnicas genéticas presentan, entre otras, las siguientes ventajas: el mayor grado de variabilidad genética examinado, la pequeña cantidad de muestra requerida para el análisis y la posibilidad de analizar muestras sometidas a tratamientos térmicos intensos, debido a la elevada estabilidad del ADN en dichos procesos (Colgan y col., 2001; Dalmaso y col., 2004).

Dentro de las técnicas genéticas, las

basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) son, sin duda, las más aplicadas al análisis de los alimentos. La técnica de PCR ha constituido una alternativa muy importante a los antiguos procedimientos moleculares de identificación de especies, como los métodos basados en hibridaciones de ADN mediante *Southern Blot* o *Dot Blot* (Chikuni y col., 1990; Ebbehøj y Thomsen, 1991; Hunt y col., 1997; Buntjer y col., 1999).

Los métodos basados en PCR empleados con mayor frecuencia para la identificación de especies en los alimentos incluyen la secuenciación (PCR-secuenciación), el análisis del polimorfismo del ADN amplificado con cebadores arbitrarios (RAPD), el análisis del polimorfismo en la longitud de fragmentos de restricción de regiones amplificadas por PCR (PCR-RFLP) o la amplificación de fragmentos de genes mediante el empleo de cebadores especie-específicos. Sin embargo, hay que señalar que la aplicación de estas técnicas para la identificación de carnes procedentes de especies de aves de caza y de la avicultura alternativa es inferior al de otras carnes de consumo habitual (Colombo y col., 2000; Brodmann y col., 2001; Maede, 2006).

A continuación se detallan las principales técnicas genéticas aplicadas a la identificación del origen animal de los alimentos.

##### II.4.2.1. Secuenciación de los fragmentos de ADN amplificados por PCR (PCR-secuenciación)

Este método de identificación de especies consiste en la amplificación de un

determinado fragmento de un gen por PCR y su posterior secuenciación. Mediante el análisis de las secuencias obtenidas se pueden identificar diferencias interespecíficas que permiten diferenciar las especies estudiadas.

Actualmente, los métodos de secuenciación más utilizados son la secuenciación manual por el método enzimático de terminación de cadena de Sanger y la secuenciación automática. El método de Sanger se basa en la utilización de isótopos radioactivos y autorradiografías de gel para la secuenciación del ADN, mientras que la secuenciación automática se realiza mediante el empleo de compuestos fluorescentes. La secuenciación por fluorescencia permite automatizar el proceso y aumentar el número de nucleótidos que se pueden determinar en cada secuenciación. Recientemente han surgido diversas técnicas alternativas de secuenciación de ADN como la pirosecuenciación, la secuenciación por nanoporos o la secuenciación por hibridación (SBH) (Shendure y col., 2008; Voelkerding y col., 2009). No obstante, a pesar de los últimos avances producidos en los equipos y metodologías, la secuenciación de fragmentos de ADN amplificados por PCR sigue siendo una herramienta analítica relativamente costosa como técnica de análisis rutinaria.

Chikuni y col. (1994) utilizaron la técnica de PCR-secuenciación para identificar codorniz, zorzal, gorrión y pollo, además de varias especies de mamíferos, en muestras de carne cruda. Para ello, amplificaron un fragmento de 646 pb del gen

mitocondrial citocromo b.

Parson y col. (2000) identificaron con éxito un total de veintidós especies de aves, incluyendo el avestruz, urogallo y becada, además de varias especies de mamíferos, reptiles, anfibios y peces. Para ello amplificaron y secuenciaron un fragmento de 358 pb en el gen mitocondrial citocromo b, a partir de muestras de sangre, tejidos blandos, testículos, ovarios, hueso, cartílago, pelo y plumas de las especies objeto de estudio. La comparación mediante el programa BLAST de las secuencias obtenidas con otras disponibles en la base de datos, permitió identificar la especie de origen en todas las muestras analizadas.

García y Arruga (2006a) secuenciaron fragmentos de 201, 314 y 336 pb en los genes de la hormona del crecimiento, 37LRP/p40 y MC1R, respectivamente, para llevar a cabo la diferenciación de pollo, perdiz chukar y perdiz roja. La comparación de las secuencias obtenidas permitió identificar numerosos polimorfismos de un solo nucleótido (SNP, *Single Nucleotide Polymorphism*) entre el pollo y las dos especies de perdiz. Asimismo, estos autores identificaron un SNP localizado en el gen de la hormona del crecimiento de perdiz roja y perdiz chukar que permitía diferenciar ambas especies.

Barilani y col. (2007) aplicaron la técnica de PCR-secuenciación para detectar hibridaciones entre individuos de perdiz roja, perdiz chukar y perdiz griega. El marcador elegido fue un fragmento de 431 pb del gen mitocondrial D-loop.

Kitano y col. (2007) llevaron a cabo la identificación de dieciséis especies de vertebrados, incluyendo aves como el avestruz, mamíferos, reptiles, anfibios y peces, a partir de muestras de sangre, carne cruda y pelo. Para ello emplearon dos parejas de cebadores conservados que amplificaban fragmentos de 215 y 244 pb en los genes mitocondriales 12S y 16S ARNr, respectivamente.

Tejedor y col. (2007) secuenciaron un fragmento de 580 pb del gen citocromo b para detectar ADN mitocondrial de perdiz chukar en muestras de sangre procedentes de una población de perdiz roja de la isla de Mallorca. La secuenciación de este fragmento permitió detectar la presencia de ADN mitocondrial de perdiz chukar en dieciséis de los noventa y tres ejemplares de perdiz roja analizados.

Lee y col. (2008) emplearon el método de PCR-secuenciación para identificar el origen animal de muestras de saliva y diversos tejidos procedentes de un total de cuarenta especies de aves, incluyendo especies como la paloma bravía y faisán. Para ello utilizaron seis parejas de cebadores que amplificaban fragmentos del gen citocromo b comprendidos entre 1527 y 220 pb.

Martínez-Fresno y col. (2008) consiguieron detectar la presencia de ADN de perdiz chukar en ejemplares de perdiz roja mediante la secuenciación de un fragmento de 234 pb del gen mitocondrial D-loop. El análisis de las secuencias obtenidas a partir del ADN extraído de plumas de ciento treinta y cinco perdices

rojas, demostró la presencia de ADN mitocondrial de perdiz chukar en catorce de las muestras analizadas.

Girish y col. (2009) amplificaron y secuenciaron un fragmento de 456 pb del gen mitocondrial 12S ARNr para la diferenciación de carne de pintada y codorniz, de la procedente de otras especies de aves de consumo habitual como el pollo, pavo y pato. La técnica permitió identificar las cinco especies analizadas tanto en muestras de carne cruda como en productos cárnicos tratados térmicamente preparados de forma experimental. Estos productos incluían empanadas de carne cocinadas a 72 °C durante 30 min, carne cocinada al vapor a 90 °C durante 30 min, carne autoclavada a 120 °C durante 30 min y croquetas fritas en aceite. No obstante, las bandas de amplificación obtenidas a partir de las muestras autoclavadas presentaron una baja intensidad en comparación con las bandas obtenidas en el resto de productos.

Lago y col. (2011) desarrollaron una técnica de PCR-FINS (*Forensically Informative Nucleotide Sequencing*) para la identificación de carne y productos cárnicos comerciales crudos y tratados térmicamente (estofados, ahumados, croquetas, salchichas, hamburguesas, escabeches, etc.) procedentes de cuarenta y dos especies de vertebrados, incluyendo la perdiz roja, perdiz chukar, perdiz pardilla, codorniz y avestruz. La técnica de PCR-FINS se basa en la elaboración de árboles filogenéticos, que permiten comparar la secuencia de la especie problema con la de otras especies previamente secuenciadas e introducidas en

las bases de datos. La amplificación de un fragmento de 555 pb del gen citocromo b y el empleo posterior de la técnica FINS permitió llevar a cabo la identificación de las especies diana en todas las muestras analizadas así como establecer relaciones filogenéticas entre las especies.

Recientemente, una nueva técnica de secuenciación denominada *DNA barcoding* o “código de barras del ADN”, está suscitando un enorme interés en el campo de la identificación de especies y del control de autenticidad de los alimentos. Esta nueva tecnología se basa en la amplificación por PCR y secuenciación de un fragmento de aproximadamente 650 pb del gen mitocondrial que codifica la subunidad 1 de la enzima citocromo c oxidasa (COI), con el objetivo de generar secuencias de ADN diagnósticas o de referencia que actúen como etiquetas de identificación molecular de las especies objeto de análisis. Así, mediante el estudio y comparación de cada secuencia de ADN diagnóstica con muestras de referencia, es posible la categorización de las secuencias y la consiguiente identificación del origen de las muestras analizadas. Este sistema aporta grandes ventajas en comparación con los estándares taxonómicos empleados por bases de datos como *Genbank/EMBL* (*European Molecular Biology Laboratory*), dado que una gran parte de las secuencias acumuladas en dicha base, no cuenta con ejemplares de referencia de las especies estudiadas. Además, otra característica innovadora de la iniciativa *DNA barcoding* es que se utiliza la información de una misma región génica, en todos los taxones y con condiciones de

secuenciación universalmente aceptadas y estandarizadas, destacando la necesidad de relacionar esta información con muestras de referencia depositadas en museos. De este modo, se pretende que el código de barras tenga una aplicación a gran escala. El número de nuevas especies identificadas está creciendo exponencialmente y se espera que durante los próximos años se complete la biblioteca de códigos de barras genéticos de todas las especies conocidas. Por todo ello, la tecnología del código de barras genético constituye una herramienta con un futuro prometedor en diversos campos científicos, incluida la trazabilidad de alimentos. No obstante, cabe resaltar que la mayoría de los estudios sobre la aplicación de la técnica de *DNA barcoding* al control de autenticidad de alimentos se centran fundamentalmente en productos derivados de la pesca (Ward y col., 2005; Smith y col., 2008; Wong y Hanner, 2008; Holmes y col., 2009; Botti y Giuffra, 2010; Zhang, 2011), siendo aún incipientes las investigaciones dirigidas a especies de aves de caza y de la avicultura alternativa, así como a otras especies de animales de abasto (Eaton y col., 2009; Dalton y Kotze, 2011). Asimismo, es importante señalar que esta técnica no resultaría adecuada para el análisis de alimentos sometidos a tratamientos térmicos intensos, ya que el tratamiento térmico degrada el ADN impidiendo la amplificación por PCR de fragmentos de elevado tamaño, como es el caso del fragmento de 650 pb del gen citocromo oxidasa (COI).

#### **II.4.2.2. Análisis del polimorfismo del ADN amplificado con cebadores arbitrarios (RAPD)**



La técnica de RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) se basa en la amplificación simultánea de múltiples fragmentos de ADN mediante PCR, utilizando para ello cebadores de cadena corta cuya secuencia se escoge al azar. Estos cebadores hibridan de manera inespecífica y aleatoria a diferentes lugares del genoma, lo que permite la amplificación de fragmentos polimórficos de ADN. El número y tamaño de los fragmentos amplificados a partir de un determinado ADN se mantiene constante siempre que se utilice el mismo cebador y se haga el análisis en las mismas condiciones. De este modo, los perfiles obtenidos mediante RAPD pueden permitir la diferenciación de los ADNs a nivel de especie o incluso a nivel de individuo.

La principal ventaja de esta técnica es que no es necesario conocer previamente las secuencias de ADN que se pretenden amplificar. Asimismo, permite examinar un gran número de polimorfismos en el ADN lo cual resulta de gran utilidad para llevar a cabo la identificación de especies íntimamente relacionadas y especies que presentan un bajo nivel de variabilidad genética. El mayor inconveniente de la técnica de RAPD reside en la dificultad de obtener resultados reproducibles, por lo que la amplificación ha de desarrollarse bajo condiciones estrictamente controladas y estandarizadas. Además, es especialmente importante que el ADN de partida no esté muy degradado, ya que de lo contrario los resultados no serán reproducibles. Este hecho dificulta la aplicación de la técnica a la identificación de especies en muestras sometidas a tratamientos térmicos ya que,

en la mayoría de ellas, el ADN se encuentra degradado (Unsel y col., 1995; Martínez e Yman, 1998). Otra limitación de la técnica de RAPD es que no permite identificar el ADN de un determinado organismo en mezclas complejas de ADN, lo que limita su aplicación al análisis de alimentos que contienen más de una especie (Martínez y Daniëlsdóttir, 2000).

La técnica de RAPD, al igual que otras técnicas genéticas, se ha aplicado con éxito para la identificación de especies en productos vegetales (Weder, 2002; Konisho y col., 2005; Koveza y col., 2005), cárnicos (Koh y col., 1998; Martínez e Yman, 1998; Sáez y col., 2004; Arslan y col., 2005; Mane y col., 2008) y pesqueros (Ali y col., 2004; Ramella y col., 2005; Mohindra y col., 2007).

Chai y col. (1997) abordaron la diferenciación de carnes crudas de faisán, perdiz pardilla, codorniz, paloma, pintada, avestruz, emú, pollo y pato mediante PCR-RAPD. Para ello utilizaron veintinueve cebadores de diez nucleótidos de longitud, con porcentajes de guanina y citosina comprendidos entre el 50 y 80 %. El empleo de los cebadores permitió obtener perfiles de bandas específicos en todas las especies analizadas, a excepción de la paloma en la que no se obtuvieron bandas de amplificación con ninguno de los cebadores empleados.

Martínez e Yman (1998) realizaron un amplio estudio de identificación mediante RAPD que incluía doce especies animales de interés comercial (avestruz, vaca, oveja, cabra, cerdo, alce, canguro, etc.). Estos autores obtuvieron perfiles específicos para

cada una de las especies, tanto en muestras de carne cruda, como en muestras congeladas y diversas conservas enlatadas y embutidos curados.

Negro y col. (2001) utilizaron la técnica de PCR-RAPD para identificar y diferenciar perdiz roja, perdiz griega e híbridos resultantes de cruces experimentales entre ambas especies, a partir de muestras de sangre. El análisis de los perfiles de bandas obtenidos tras la amplificación de las muestras con seis cebadores arbitrarios permitió identificar diversas bandas especie-específicas de perdiz roja y perdiz griega. Los individuos híbridos presentaron bandas características de las dos especies.

Huang y col. (2003) llevaron a cabo la identificación y diferenciación de codorniz, faisán, paloma, avestruz, emú y otras especies de aves domésticas en carne cruda mediante la utilización de una técnica de PCR-RAPD. En este estudio, se comprobó la aplicabilidad de la técnica para la detección de las especies diana en mezclas cárnicas mediante el análisis de mezclas binarias crudas que contenían diversos porcentajes de carne de avestruz en carne de vaca. El empleo de la técnica de RAPD desarrollada permitió detectar la presencia de avestruz en todas las mezclas analizadas. No obstante, no se analizaron mezclas cárnicas del resto de especies ni muestras tratadas térmicamente.

Barbanera y col. (2005) consiguieron diferenciar ejemplares de perdiz roja, perdiz chukar y sus híbridos, mediante el empleo de cuatro cebadores arbitrarios. Los perfiles

obtenidos con cada cebador mostraron una banda especie-específica de perdiz roja y otra de perdiz chukar, mientras que los individuos híbridos presentaban ambas bandas. Posteriormente, estos autores utilizaron la misma técnica para la detección de híbridos de perdiz roja y perdiz chukar en diversas poblaciones de perdiz roja y perdiz chukar de Europa, Asia y Estados Unidos (Barbanera y col., 2007, 2009, 2010).

García y Arruga (2006b) emplearon cuatro cebadores arbitrarios para detectar la presencia de individuos híbridos resultantes de cruces entre perdiz roja y perdiz chukar, en poblaciones de perdiz roja salvajes y de granja.

Ilhak y Arslan (2007a) identificaron mediante esta técnica carnes crudas de codorniz, perdiz, avestruz, gaviota, cuervo, pollo, pavo, pato y oca. Para ello emplearon doce cebadores de diez nucleótidos de longitud.

Barbanera y col. (2011) utilizaron dos cebadores arbitrarios en una técnica de PCR-RAPD para la detección de híbridos resultantes de cruces experimentales entre perdiz roja y perdiz moruna.

#### **II.4.2.3. Estudio de secuencias repetitivas del ADN nuclear**

Las secuencias repetitivas del ADN nuclear se clasifican atendiendo a su tamaño en satélites, minisatélites y microsatélites. Los más empleados en la actualidad son los marcadores microsatélites que consisten en segmentos cortos de ADN de 1 a 6 pb que se repiten en tándem y de forma aleatoria en el genoma de los seres vivos. Estos

marcadores son muy informativos, ya que suelen ser muy polimórficos, generalmente se encuentran en zonas no codificantes del ADN, son codominantes, poseen una alta tasa de mutación y son fácilmente amplificables mediante PCR. Debido a estas características, estas regiones constituyen interesantes marcadores para la identificación de especies (Goldstein y Schlötterer, 1999; Zane y col., 2002).

En el campo de la identificación de especies de aves de caza y de la avicultura alternativa, el estudio de las secuencias repetitivas del ADN cromosómico se ha dirigido, sobre todo, al análisis filogenético y de la variabilidad genética existente entre poblaciones, publicándose diversos estudios en especies como la codorniz (Kayang y col., 2002; Barilani y col., 2005), perdiz (Baratti y col., 2005; Tejedor y col., 2005; Arruga y col., 2007b; Barilani y col., 2007; Scandura y col., 2010), faisán (Baratti y col., 2001), pintada (Kayang y col., 2010), paloma (Traxler y col., 2000; Ramadan y col., 2011) y avestruz (Tang y col., 2003; Kawka y col., 2007; Huang y col., 2008). No obstante, hasta el momento no existen estudios que empleen esta técnica para la diferenciación de estas especies en carnes y productos cárnicos.

#### **II.4.2.4. Análisis del polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción de regiones amplificadas por PCR (PCR-RFLP)**

La técnica de PCR-RFLP se basa en la amplificación de fragmentos de ADN específicos mediante PCR y su posterior tratamiento con enzimas de restricción, que

los cortan en fragmentos más pequeños. Las diferencias existentes en la secuencia nucleotídica entre las distintas especies estudiadas, darán lugar a fragmentos de diferentes tamaños que se examinan mediante electroforesis (Fajardo y col., 2006, 2007a).

La técnica de PCR-RFLP ha sido ampliamente utilizada para la identificación de especies en carne y productos cárnicos, siendo una de las metodologías más empleadas para llevar a cabo la identificación de aves de caza y de la avicultura alternativa.

Abdulmawjood y Büelte (2002) desarrollaron una técnica de PCR-RFLP para la diferenciación de avestruz de otras especies como pollo, pavo, pato, cerdo, vaca, oveja y cabra, mediante la amplificación de un fragmento conservado de 359 pb del gen mitocondrial citocromo b, seguida de la restricción con las endonucleasas *HaeIII*, *HinfI*, *RsaI* y *Tru91*. Para ello analizaron muestras de carne cruda de las especies diana así como diversos preparados experimentales elaborados con carne de avestruz tratada a 100 °C durante 10, 30 o 60 min.

Maede (2006) empleó cebadores específicos de aves (avestruz, pollo, pavo, pato y oca), cérvidos, bovinos, porcinos y equinos, y ocho enzimas de restricción distintas para la autenticación de carne y productos cárnicos mediante PCR-RFLP. Además, este autor verificó los resultados obtenidos mediante una técnica de PCR-secuenciación. Los cebadores específicos de aves permitieron la amplificación de un

fragmento de 359 pb del gen citocromo b. La posterior digestión de este fragmento con las enzimas seleccionadas permitió diferenciar la carne procedente de aves de la carne del resto de especies animales. No obstante, esta técnica no permitía la diferenciación entre las distintas especies de aves analizadas.

Arruga y col. (2007a) aplicaron una técnica de PCR-RFLP basada en la digestión de un fragmento de 441 pb del gen nuclear de la rodopsina para diferenciar perdiz roja, perdiz chukar y sus híbridos. La digestión del fragmento diana con la enzima *Apal* generó dos bandas de 354 y 87 pb en perdiz chukar y perdices híbridas, mientras que en perdices rojas puras no se produjo digestión del fragmento amplificado debido a la ausencia de dianas de restricción para la enzima seleccionada.

Girish y col. (2007) diferenciaron codorniz, pintada, pollo, pavo y pato mediante la digestión enzimática con *HinfI*, *Mph1103I*, *MvaI* y *Eco47I* de un fragmento conservado de 456 pb amplificado en el gen mitocondrial 12S ARNr. La técnica se aplicó con éxito en muestras de sangre y carne cruda así como en diversos productos cárnicos tratados térmicamente preparados de forma experimental. Estos productos incluían empanadas de carne fritas (72 °C durante 30 min), carne cocinada al vapor (90 °C durante 30 min), croquetas cocinadas (180 °C durante 5 min) y carne autoclavada (120 °C durante 30 min). A pesar de obtener resultados satisfactorios en todas las muestras tratadas analizadas, las bandas de amplificación obtenidas a partir de las

muestras autoclavadas presentaron una baja intensidad.

Saini y col. (2007) también aplicaron con éxito una técnica de PCR-RFLP basada en la digestión de un fragmento de 446 pb de gen 12S ARNr con las enzimas *AluI* y *Sau3AI*, para identificar codorniz, pavo real, pollo, pavo y pato. No obstante, estos autores sólo emplearon la técnica para el análisis de muestras de sangre, no demostrándose su aplicabilidad para la identificación de las especies diana en carne cruda y tratada térmicamente.

Murugaiah y col. (2009) utilizaron un fragmento de 359 pb del gen mitocondrial citocromo b y las enzimas de restricción *AluI*, *BsaI*, *RsaI*, *MseI* y *BstUI*, para la diferenciación de carne cruda de codorniz, pollo, vaca, cerdo, cabra, conejo y búfalo. La técnica permitió también la identificación de distintos porcentajes de vaca, cerdo y pollo (1, 3, 5 y 10 %) en mezclas cárnicas crudas experimentales constituidas por vaca y cerdo, o pollo y cerdo. No obstante, no se comprobó la aplicabilidad de la técnica para la identificación del resto de especies diana en mezclas cárnicas, ni para el análisis de carnes tratadas térmicamente.

Stamoulis y col. (2010) llevaron a cabo la identificación y diferenciación de codorniz, faisán, perdiz griega, becada, zorzal común, avestruz, pollo, pavo, pato, oca, cerdo, vaca y oveja, mediante la digestión de fragmentos de 380 y 480 pb de los genes mitocondriales citocromo b y 12S ARNr, respectivamente, con las enzimas *AccI*, *AluI*, *Avall*, *DdeI*, *HaeIII*, *HinfI*, *HhaI*, *Mbol*, *MseI* y *TaqI*. La digestión del

fragmento de 480 pb del gen 12S ARNr con la enzima *AcI* permitió diferenciar todas las especies analizadas. Por el contrario, en el caso del ensayo basado en el gen citocromo b, se necesitó emplear una combinación de todas las enzimas seleccionadas para poder diferenciar todas las especies analizadas. La técnica se aplicó con éxito tanto en carne cruda como productos cárnicos curados y cocinados. No obstante, no resultó adecuada para el análisis de productos cárnicos sometidos a tratamientos térmicos intensos debido a la ausencia de amplificación de los fragmentos de 380 y 480 pb. En este trabajo también se comprobó la aplicabilidad de la técnica para el análisis de mezclas cárnicas. Para ello se analizaron varias salchichas que indicaban la presencia de carne de avestruz en el etiquetado. Los resultados obtenidos tras la amplificación del fragmento de 480 pb del gen 12S ARNr y su posterior digestión con la enzima de restricción *AcI*, demostraron que las salchichas de avestruz contenían una mezcla de carne de avestruz y carne de cerdo. No obstante, no se analizaron mezclas cárnicas del resto de especies animales objeto de estudio.

A diferencia de otras metodologías como la secuenciación de fragmentos amplificados por PCR (PCR-secuenciación), la técnica de PCR-RFLP es sencilla, rápida y no requiere el uso de instrumental complejo (Pascoal y col., 2004). Sin embargo, presenta limitaciones a la hora de analizar alimentos sometidos a tratamientos térmicos intensos u otros métodos de procesado donde el ADN se encuentre muy degradado. Asimismo, esta técnica no resulta apropiada para el análisis de productos cárnicos que

contienen dos o más especies en su composición debido a que los perfiles de restricción resultantes consistirían en una mezcla de patrones de bandas característicos de cada una de las especies presentes en el producto, dificultando la interpretación de los resultados.

#### **II.4.2.5. PCR con cebadores específicos**

Una de las estrategias más comúnmente utilizadas en las técnicas de PCR aplicadas a la identificación de especies, consiste en el diseño de cebadores específicos para la amplificación selectiva de fragmentos de ADN a partir de diferentes organismos. Así, la técnica de PCR con cebadores específicos se ha utilizado para la identificación de un elevado número de especies en productos como la leche y productos lácteos (De la Fuente y Juárez, 2005; López-Calleja y col., 2005a, b; Mayer, 2005; De y col., 2011), pescado (Lockley y Bardsley, 2000; Sezaki y col., 2005; Hubalkova y col., 2008) y carne y productos cárnicos (Lockley y Bardsley, 2002; Rodríguez y col., 2004; Di Pinto y col., 2005; Salem y col., 2009; Soares y col., 2010; Zha y col., 2010). No obstante, la aplicación de esta técnica para la identificación de especies de aves de caza y de la avicultura alternativa está menos generalizada.

Colombo y col. (2000) diseñaron una pareja de cebadores en el gen mitocondrial citocromo b para la diferenciación de carne de avestruz y emú. Los cebadores diseñados amplificaron un fragmento de 534 pb en avestruz, mientras que el amplicón generado con los mismos cebadores en las

muestras de emú fue de 229 pb. No obstante, la técnica sólo se empleó para el análisis de muestras de carne cruda, no comprobándose su utilidad para el análisis de muestras tratadas térmicamente. Además, tampoco se determinó el límite de detección de los cebadores diseñados.

Stirtzel y col. (2007) desarrollaron una técnica de PCR empleando el gen mitocondrial citocromo b para la identificación de codorniz, faisán, pintada, pollo, pavo, pato y oca mediante la amplificación de fragmentos específicos de especie. La especificidad de los cebadores se comprobó frente a especies como el avestruz, oveja, cabra, caballo y canguro. Los cebadores permitieron la amplificación del fragmento específico tanto en muestras de carne cruda, como en diversos productos comerciales tratados térmicamente (patés, salchichas, etc.) que contenían carne de las especies diana. No obstante, al igual que en el trabajo anterior (Colombo y col., 2000), no se evaluó el límite de detección de la técnica.

Haunshi y col. (2009) utilizaron también el gen citocromo b en una técnica de PCR para la detección específica de paloma, pollo, pato y cerdo, mediante la amplificación específica de fragmentos de 401, 256, 292 y 835 pb, respectivamente. Además, estos autores verificaron los resultados obtenidos mediante la secuenciación de los fragmentos amplificados. Los cebadores específicos permitieron detectar la especie diana en muestras de sangre y carne cruda así como en carne cocinada (80 °C durante 30 min) y autoclavada (121 °C durante 20 min), a excepción de las

muestras de carne de cerdo autoclavadas en las que no se obtuvo amplificación debido al elevado tamaño del fragmento diana (835 pb). El límite de detección de los ensayos no fue determinado.

Nau y col. (2009) emplearon con éxito la técnica de PCR para diferenciar huevos procedentes de pintada, pollo, pavo y oca. Para ello diseñaron cebadores específicos que amplificaban fragmentos de 641, 491, 185 y 104 pb del gen citocromo b a partir del ADN de pintada, pollo, pavo y oca, respectivamente. La sensibilidad de los cebadores se evaluó mediante el análisis de mezclas de huevo líquido y deshidratado de las especies diana, obteniéndose un límite de detección del 0,1 % en todos los casos.

En comparación con otras técnicas genéticas alternativas como el método de PCR-secuenciación o los ensayos de PCR-RFLP, la técnica de PCR con cebadores especie-específicos ofrece las ventajas de ser más rápida y útil para el análisis de un elevado número de muestras. Asimismo, permite llevar a cabo la identificación de especies en muestras cárnicas sometidas a tratamientos térmicos, así como en muestras con varias especies en su composición. Su principal inconveniente radica en la necesidad de conocer previamente las secuencias de las especies que se pretenden diferenciar, a fin de poder diseñar oligonucleótidos específicos para cada una de ellas (Pascoal y col., 2005; Fajardo y col., 2007b).

#### **II.4.2.6. PCR en tiempo real**

En la actualidad, los ensayos de PCR que se desarrollan en varios pasos, desde la

amplificación del material genético al análisis de los productos resultantes, están evolucionando hacia procedimientos más rápidos y automatizados en un solo tubo. Estos avances en las técnicas de PCR se basan en la utilización de equipos con un sistema de detección espectrofluorimétrica, que permiten identificar en tiempo real el producto de amplificación generado.

En los últimos años, se han descrito varios tipos de ensayos de PCR en tiempo real, que se pueden dividir en dos grandes grupos: sistemas no específicos y específicos. Los sistemas no específicos detectan la presencia o ausencia de amplicones, pero no proporcionan información sobre la identidad de los productos generados. En este tipo de ensayos se incluyen, por ejemplo, los que utilizan agentes intercaladores fluorescentes de la doble cadena de ADN como el bromuro de etidio y el SYBR<sup>®</sup> Green. En los sistemas específicos se emplean diversos tipos de sondas fluorescentes (TaqMan<sup>®</sup>, FRET, *Molecular Beacons* y *Scorpions*), que hibridan específicamente en la secuencia del ADN diana. Dentro de los sistemas específicos, las sondas de hibridación tipo TaqMan<sup>®</sup> son las más utilizadas (López-Andreo y col., 2005; Rensen y col., 2006; Laube y col., 2007; López-Calleja y col., 2007; Jonker y col., 2008).

A pesar del elevado número de trabajos publicados que emplean la técnica de PCR en tiempo real para la detección de especies animales en productos cárnicos (Walker y col., 2003, 2004; Dooley y col., 2004; Hird y col., 2005; López-Andreo y col.,

2006; Schöenbrucher y col., 2007; Tanabe y col., 2007; Eugster y col., 2008; Jonker y col., 2008), la aplicación de esta técnica para la detección de carnes procedentes de aves de caza y de la avicultura alternativa ha sido muy escasa. Hasta el momento, los únicos trabajos publicados son los desarrollados por López-Andreo y col. (2005) y Chisholm y col. (2008a).

López-Andreo y col. (2005) desarrollaron una técnica de PCR en tiempo real para identificar ADN de avestruz, pollo, pavo, vaca, cerdo y oveja. Para ello emplearon parejas de cebadores específicos de especie y dos sondas TaqMan<sup>®</sup> MGB diseñados en la región del genoma mitocondrial comprendida entre la subunidades 5 y 6 de la NADH deshidrogenasa y el gen citocromo b, que amplificaban fragmentos de pequeño tamaño (<150 pb). Una de las sondas TaqMan<sup>®</sup> MGB se empleó como sistema de detección con los cebadores específicos de vaca, oveja y cerdo, mientras que la otra se utilizó para la detección de avestruz, pollo y pavo. Además, estos autores emplearon como control endógeno una pareja de cebadores y una sonda diseñados en el gen 18S ARNr para la amplificación de un fragmento de 120 pb en organismos eucariotas. Los sistemas desarrollados permitieron la detección y cuantificación de las especies diana en muestras de carne cruda y liofilizada, así como en mezclas cárnicas experimentales y productos comerciales (salchichas y hamburguesas). El límite de detección alcanzado fue del 1 % en avestruz, cerdo, pollo y pavo, y del 5 % en vaca y oveja. No obstante, no se evaluó la aplicabilidad de la técnica para la detección y cuantificación de

las especies diana en carne y productos cárnicos tratados térmicamente.

Chisholm y col. (2008a) utilizaron también sondas TaqMan® para la identificación de carne de codorniz y faisán. Los cebadores y sondas empleados, diseñados en el gen mitocondrial citocromo b, permitieron la amplificación de fragmentos específicos de 67 y 78 pb a partir del ADN de codorniz y faisán, respectivamente. La amplificación se produjo tanto en muestras de carne cruda como en carne cocinada a 180 °C durante 120 min y autoclavada a 121 °C durante 15 min, así como en diversos productos comerciales crudos y tratados térmicamente (conservas escabechadas, paté, estofados, etc.). La especificidad de los cebadores se comprobó frente a un número elevado de especies, incluyendo aves como la perdiz, paloma y pintada, entre otras. El límite de detección de la técnica fue de 2 pg para codorniz y 10 pg para faisán.

La técnica de PCR en tiempo real presenta numerosas ventajas en el análisis rutinario de los alimentos. Por ejemplo, el tiempo necesario para obtener los resultados se reduce, al no requerir el análisis electroforético posterior de los productos de PCR. Además, al realizarse todo el proceso en el mismo tubo, se minimizan las posibilidades de contaminación con ADN exógeno y se facilita la automatización. No obstante, el mayor inconveniente de estos sistemas es su elevado coste en comparación con otros métodos de PCR como la técnica de PCR-RFLP o la técnica de PCR convencional con cebadores específicos, así como la necesidad de

personal especializado para la puesta a punto de los métodos.

#### **II.4.2.7. Microarrays de ADN**

Los microarrays de ADN son dispositivos innovadores consistentes en un gran número de fragmentos de ADN de una sola hebra (sondas), ordenados en dos dimensiones y unidos a la superficie de un pequeño soporte sólido. Los ácidos nucleicos de las muestras a analizar se marcan y se incuban sobre la matriz con las sondas, produciéndose la hibridación de las secuencias homólogas. Así, el material genético marcado, se une a su complementario inmovilizado en el soporte del chip, permitiendo la identificación del ADN presente en la muestra. Con posterioridad, el escáner y las herramientas informáticas permiten interpretar y analizar los datos obtenidos. La principal ventaja de esta tecnología reside en la posibilidad de analizar simultáneamente miles de genes.

Desde su descubrimiento a finales de la década de los ochenta, los microarrays de ADN han ido introduciéndose de forma progresiva en las principales áreas de investigación biomédica y biotecnológica. Actualmente esta tecnología se está aplicando al análisis de la expresión génica, detección de mutaciones, secuenciación, seguimiento de terapias, medicina preventiva, toxicología de fármacos y diagnóstico molecular. Además, el análisis mediante microarrays de ADN también se ha aplicado con éxito a la caracterización de poblaciones de la misma especie y de razas (Suekawa y col., 2010), así como a la detección e identificación de especies animales en los



alimentos.

Entre los escasos trabajos que emplean la técnica de microarrays de ADN para la identificación de especies de aves de caza y de la avicultura alternativa, cabe citar los ensayos descritos por Chisholm y col. (2008b) y Teletchea y col. (2008).

Chisholm y col. (2008b) utilizaron el sistema *FoodExpert ID*<sup>®</sup> desarrollado por BioMerieux (Marcy-l'Etoile, Francia), para detectar e identificar hasta treinta y dos especies animales, incluyendo aves como el avestruz y pintada, mamíferos y peces. El sistema *FoodExpert ID*<sup>®</sup> está constituido por un chip de ADN que contiene aproximadamente unas 80 000 sondas complementarias a secuencias específicas del gen citocromo b de vertebrados. Para utilizar este sistema, el ADN de las muestras se amplifica y posteriormente se transcribe en ARN, se marca con compuestos fluorescentes y se hibrida con el chip. Las secuencias complementarias a las sondas del chip se unen a este y son detectadas mediante un lector de fluorescencia. El ensayo desarrollado por Chisholm y col. (2008b) empleando este sistema permitió detectar las especies diana en muestras de carne cruda, productos cárnicos tratados térmicamente y piensos. El límite de detección de este chip fue de un 1 % para cerdo, oveja y vaca, y de un 0,1 % para pollo y pavo. No

obstante, no se determinó el límite de detección para el resto de especies analizadas.

Con relación a la técnica descrita por Teletchea y col. (2008), estos autores consiguieron identificar setenta y una especies de animales vertebrados, entre ellas el avestruz y la codorniz, en alimentos y muestras forenses. Para ello, emplearon una pareja de cebadores que amplificaba un fragmento conservado de 373 pb del gen citocromo b. Además, diseñaron otras dos parejas de cebadores que amplificaban fragmentos de 268 y 124 pb comprendidos en la secuencia del gen citocromo b de 373 pb. Para preparar el microarray se diseñaron sondas especies-específicas para cada una de las especies analizadas. La hibridación de los fragmentos amplificados con el microarray permitió la detección de las especies diana en muestras cárnicas y pelo. Además, estos autores demostraron la aplicabilidad de la técnica para el análisis de mezclas cárnicas y alimentos procesados (salchichas, carne deshidratada, patés y conservas) y la compararon con otras técnicas como la secuenciación. La técnica de microarrays demostró ser más adecuada que la secuenciación ya que permitió detectar un mayor número de especies en las mezclas y productos cárnicos analizados.

*CAPÍTULO III*  
*Results and Discussion*  
*(Published articles)*

---

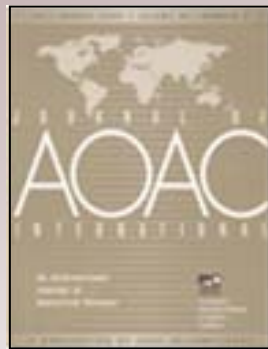




### III.1. IDENTIFICATION OF MEAT AND MEAT PRODUCTS FROM GAME AND ALTERNATIVE POULTRY FARMING AVIAN SPECIES BY GENETIC TECHNIQUES

#### III.1.1 PCR-RFLP

- Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism authentication of raw meats from game birds.



***Journal of AOAC International***  
Volume 91, pages 1416-1422, 2008

- Identification of raw and heat-processed meats from game bird species by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism of the mitochondrial D-loop region.



***Poultry Science***  
Volume 88, pages 669-679, 2009



## Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism Authentication of Raw Meats from Game Birds

MARÍA ROJAS, ISABEL GONZÁLEZ, VIOLETA FAJARDO, IRENE MARTÍN, PABLO E. HERNÁNDEZ, TERESA GARCÍA, and ROSARIO MARTÍN<sup>1</sup>

Universidad Complutense, Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, 28040 Madrid, Spain

**Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) analysis has been applied to the identification of meats from quail (*Coturnix coturnix*), pheasant (*Phasianus colchicus*), red-legged partridge (*Alectoris rufa*), guinea fowl (*Numida meleagris*), capercaillie (*Tetrao urogallus*), Eurasian woodcock (*Scolopax rusticola*), woodpigeon (*Columba palumbus*), and song thrush (*Turdus philomelos*). PCR amplification was performed using a set of primers flanking a conserved region of approximately 720 base pairs (bp) from the mitochondrial 12S rRNA gene. Restriction site analysis based on sequence data from this DNA fragment permitted the selection of *AluI* and *BfaI* endonucleases for species identification. The restriction profiles obtained when amplicons were digested with the chosen enzymes allowed the unequivocal identification of all game bird species analyzed. However, the use of the PCR-RFLP technique described is limited to raw meat authentication. It is not suitable for cooked products because thermal treatment strongly accelerates DNA degradation leading to difficulties in amplifying the 720 bp fragment.**

The consumption of game meat is increasing in many parts of the world because game meat is low in fat and cholesterol and has a fine texture and delicate flavor when prepared properly (1). However, falsification of game meat and game meat products is very common due to the tremendous profit that results from selling less costly meat as meat from the higher priced species that are in great demand (2). Thus, the prevention of such fraudulent practices constitutes an important part of food regulatory control and quality assurance systems (3). Furthermore, game law enforcement authorities need to differentiate meat of protected species from that of unprotected and domestic

animals. In most cases this is imperative for the implementation of legislative measures (4).

In order to protect consumers from fraud and food adulteration, several analytical approaches have been made to identify animal species in meat products (5). Several methods that rely on protein analysis have been described, including electrophoretic, immunological, chromatographic, and mass spectrometric techniques. However, the presence and characteristics of proteins are tissue-dependent, and the manipulation of meat proteins during processing may alter their structure and stability (3). Moreover, cross-reactions of closely related species cannot be ruled out by protein-based methods (6). Thus, for species identification, DNA analysis would be preferable to protein analysis (7).

Among DNA-based methods, polymerase chain reaction (PCR) coupled with nucleotide sequencing (8), random amplified polymorphic DNA (RAPD; 7), PCR with species-specific primers (9, 10), or restriction fragment length polymorphism (RFLP; 1, 11–13), have been extensively applied for meat species identification. PCR-RFLP allows the amplification of a conserved region of DNA sequence using PCR, and the detection of genetic variation between species by digestion of the amplified fragment with restriction enzymes (14). An extensive number of works that use the PCR-RFLP technique have recently been developed for the identification of game meat species such as red deer, fallow deer, roe deer, chamois, Pyrenean ibex, and mouflon (1, 12). However, fewer studies have been published reporting the application of PCR-RFLP for authentication of game bird meat.

Meat from game birds is becoming increasingly popular in European markets. In recent years, production of typical game bird species in alternative poultry farms has contributed to an increase in the offering of this kind of meat. The main species produced in these farms are quail (*Coturnix coturnix*), pheasant (*Phasianus colchicus*), red-legged partridge (*Alectoris rufa*), and guinea fowl (*Numida meleagris*). Other important game bird species, whose meat comes only from hunting, are capercaillie (*Tetrao urogallus*), Eurasian woodcock (*Scolopax rusticola*), woodpigeon (*Columba palumbus*), and song thrush (*Turdus philomelos*). It is important to emphasize that capercaillie is a protected species in some countries, where hunting and consumption of its meat is penalized by law. In the present work, we describe a method

Received April 18, 2008. Accepted by SG July 4, 2008.

<sup>1</sup> Author to whom correspondence should be addressed; e-mail: rmartins@vet.ucm.es

**Figure 1.** DNA sequences from part of the 12S rRNA gene of quail (*C. coturnix*), pheasant (*P. colchicus*), red-legged partridge (*A. rufa*), guinea fowl (*N. meleagris*), capercaillie (*T. urogallus*), Eurasian woodcock (*S. rusticola*), woodpigeon (*C. palumbus*), song thrush (*T. philomelos*), chicken (*G. gallus*), turkey (*M. gallopavo*), Muscovy duck (*C. moschata*), and goose (*A. anser*). Restriction sites for *AluI* (AGCT) and *BfaI* (CTAG) are shaded. Bold-type nucleotides indicate the position of primers 12S-FW and 12S-REV used for PCR amplification.

1418 ROJAS ET AL.: JOURNAL OF AOAC INTERNATIONAL VOL. 91, NO. 6, 2008

		421	<b>AluI</b>		<b>AluI</b>		<b>AluI</b>		<b>BfaI</b>		490
<i>C. coturnix</i>	(AM902516)	CCGTGCGCCAG	CCCACCT-TA	ATGAAAGAAC	AACAGT <b>CAGC</b>	TCAATAGC-C	GC----	CACT	AATAAGACAG		
<i>P. colchicus</i>	(AM902515)	CCGTGCGCCAG	CCCACCT-AA	ATGAAAGGCC	AACAGT <b>CAGC</b>	TCAACAGT-C	CA----	CACT	AGCAAGACAG		
<i>A. rufa</i>	(AM902517)	CCGTGCGCCAG	<b>CT</b> CACCTCCA	ATGAAAGGCC	AACAGT <b>GAGC</b>	CCAACAGT-C	CC----	CACT	AATAAGACAG		
<i>N. meleagris</i>	(AM902518)	CCGTGCGCCAG	CCCACCTACA	-TGAAAGCGC	AACAGT <b>CAGC</b>	TCAACAGT-C	CC----	CACT	AACAAGACAG		
<i>T. urogallus</i>	(AM902520)	CCGTGCGCCAG	CCCACCT-AA	ATGAAAGACC	AAAAGT <b>CAGC</b>	TCAATAGT-C	C-----	CCGCT	AACAAGACAG		
<i>S. rusticola</i>	(AM902519)	CCGTGCGCCAG	<b>AG</b> <b>CT</b> CACCTCCA	ATGAG <b>AGCTA</b>	TATAGT <b>GAGC</b>	ACAATAGTCC	ACAACCCACT		AACAAGACAG		
<i>C. palumbus</i>	(AM902521)	CCGTGCGCCAG	<b>CT</b> CACCTCTT	CTGAGAGTAC	CACAGT <b>GAGC</b>	ACAACCCGCTC	TAACCCCGCT		AACAAGACAG		
<i>T. philomelos</i>	(AM902522)	CCGTGCGCCAG	CCCACCTCTT	CTGACAGCCC	AACAGT <b>GAGC</b>	GCAATAGT-C	TAACCC-GCT		AGTAAGACAG		
<i>G. gallus</i>	(NC001323)	CCGTGCGCCAG	CCCACCTCTA	ATGAAAGAAC	AACAGT <b>CAGC</b>	TCAATAGC-C	CC----	TGCT	AATAAGACAG		
<i>M. gallopavo</i>	(U83741)	CCGTGCGCCAG	CCCACCTAAA	ATGAAAGATC	AATAGT <b>CAGC</b>	TCAATAGT-C	C-----	CACT	AACAAGACAG		
<i>C. moschata</i>	(AM902523)	CCGTGCGCCAG	CCCACCTCGA	ATGAGAGCAC	AACAGT <b>GAGC</b>	GCAACAGCAC	CC----	CCGCT	AATAAGACAG		
<i>A. anser</i>	(AY164530)	CCGTGCGCCAG	CCCACCTCGA	ATGAGAGCAC	AACAGT <b>GAGC</b>	ACAATAGCAC	CC----	C-GCT	AATAAGACAG		
		491	<b>AluI</b>				<b>BfaI</b>		<b>BfaI</b>		560
<i>C. coturnix</i>	(AM902516)	GTCAAGGTAT	AGCCTATGGG	ATGGAAGAAA	TGGGCTACAT	TTTCTA-AAA	-TAGAACAA-		--ACGAAAAA		
<i>P. colchicus</i>	(AM902515)	GTCAAGGTAT	AGCCCATGGG	GTGGAAGAAA	TGGGCTACAT	TTTCTA-ATA	-TAGAATA--		--AACGAAAAA		
<i>A. rufa</i>	(AM902517)	GTCAAGGTAT	AGCCTATGGG	GTGGAAGAAA	TGGGCTACAT	TTTCTA-ATA	-TAGAATA--		--ACGGAAAAA		
<i>N. meleagris</i>	(AM902518)	GTCAAGGTAT	AGCCCATGAG	GTGGAAGAAA	TGGGCTACAT	TTTCTA-ATA	-TAGAATA--		--ACGAAAAA		
<i>T. urogallus</i>	(AM902520)	GTCAAGGTAT	AGCCCATGGG	GTGGAAGAAA	TGGGCTACAT	TTTCTA-ACA	-TAGAATACT		--CACGAAAAA		
<i>S. rusticola</i>	(AM902519)	GTCAAGGTAT	<b>AGCT</b> AATGGA	GTGGAAGAAA	TGGGCTACAT	TTTCTA-ATA	-TAGAATAACC		ATACGGGAAGG		
<i>C. palumbus</i>	(AM902521)	GTCAAGGTAT	AGCCCATGAA	GTGGAAGAAA	TGGGCTACAT	TTTCTAACT--	-TAGAAAAATC		TCACGAATAG		
<i>T. philomelos</i>	(AM902522)	GTCAAGGTAT	AGCCTATGGA	ATGGAAGCAA	TGGGCTACAT	TTT <b>CTAGAT</b> -	-TAGAACAT--		--ACGGATAG		
<i>G. gallus</i>	(NC001323)	GTCAAGGTAT	AGCCTATGGG	GTGGGAGAAA	TGGGCTACAT	TTTCTA-ACA	-TAGAACAA-		--ACGAAAAA		
<i>M. gallopavo</i>	(U83741)	GTCAAGGTAT	AGCCCATGAG	GTGGAAGAAA	TGGGCTACAT	TTTCTA-ACA	-TAGAAGACAT		--ACGAAAAA		
<i>C. moschata</i>	(AM902523)	GTCAAGGTAT	AGCCCATGGG	GGCGAAGAAA	TGGGCTACAT	TCCTTACACA	<b>CTAG</b> GGCAG-		-CACGAAAG		
<i>A. anser</i>	(AY164530)	GTCAAGGTAT	AGCCTATGGA	GTGGAAGAAA	TGGGCTACAT	TCCTTATTCA	-TAGGGCA--		-CACGGAAAG		
		561	<b>BfaI</b>				<b>AluI</b>		<b>AluI</b>		630
<i>C. coturnix</i>	(AM902516)	GGACATGAAA	CCTGGTCCCT	GGAAGGAGGA	TTTAGCAGTA	AAATGGGATC	ACTT--T---		--GCCCACT		
<i>P. colchicus</i>	(AM902515)	GGACGTGAAA	CCG-GTCCCT	GGAAGGAGGA	TTTAGCAGTA	AAGTAGGACC	ATGCC-TCTT		CAAGCCTACT		
<i>A. rufa</i>	(AM902517)	GGACATGAAA	ACCCTGCTCA	GGAAGGAGGA	TTTAGCAGTA	AGATGAGATC	ATCC--CC--		-- <b>AGCT</b> CACC		
<i>N. meleagris</i>	(AM902518)	GAGCATGAAA	CTG-GCCCT	GGAAGGAGGA	TTTAGCAGTA	AAATGGGACAT	ATAC--ATCT		TAGGCCATT		
<i>T. urogallus</i>	(AM902520)	GGCGTGAATA	<b>CTA</b> GTCCCT	GGAAGGAGGA	TTTAGCAGTA	AAATAGGATC	ATAC--TTTT		CAAGCCTACT		
<i>S. rusticola</i>	(AM902519)	GGGCGATGAAA	CTAGT-CCCC	GGAAGGCGGA	TTTAGCAGTA	<b>AGCT</b> CGACA	ATAC-----		--AGCCTACT		
<i>C. palumbus</i>	(AM902521)	GGGTATGAAA	CAA--CCCT	GGAAGGTGGA	TTTAGCAGTA	AAGCGGGACA	ATAT-----		--AGCCCTCT		
<i>T. philomelos</i>	(AM902522)	GGGTATGAAA	CTG--CCCT	GGAAGGCGGA	TTTAGCAGTA	AAGAGAGACA	ATCG-----		--AGCCCTCT		
<i>G. gallus</i>	(NC001323)	GGATGTGAAA	CCG-GCCCT	GGAAGGAGGA	TTTAGCAGTA	AAGTAGAGAT	ATAC--CCCC		<b>TAGCT</b> CACT		
<i>M. gallopavo</i>	(U83741)	GGGCGTGAAA	CTCG-CCCTT	GGAAGGAGGA	TTTAGCAGTA	AAGTAAGACC	ATACTTCTCT		<b>TAGCCT</b> ACT		
<i>C. moschata</i>	(AM902523)	AAGCATGAAA	CTG--CTTCT	GGAAGGAGGA	TTTAGCAGTA	AAGTGGGACA	ATAG-----		--AGCCTACT		
<i>A. anser</i>	(AY164530)	AAGCGTGAAA	CCA--CTTCT	GGAAGGCGGA	TTTAGCAGTA	AAGTGGGACA	ATAG-----		--AGCCTACT		
		631	<b>BfaI</b>				<b>AluI</b>				700
<i>C. coturnix</i>	(AM902516)	TTAAGATGGC	CCTGAGGCAC	GTACATACCG	CCCCTCACCC	TCTTCA-AAA	<b>GCT</b> ACTAATA		CCGATAAATA		
<i>P. colchicus</i>	(AM902515)	TTAAGACGGC	CCTGGGGCAC	GTACATACCG	CCCCTCACCC	TCTTCG-CAG	GCCACCAATA		CTAATAAATA		
<i>A. rufa</i>	(AM902517)	TTAAGACGGC	CTTGGGGCAC	GTACATACCG	CCCCTCACCC	TCTTCAATAA	GCCATAAACA		CCAATAAATA		
<i>N. meleagris</i>	(AM902518)	TTAAGCCGGC	CTTGGGGCAC	GTACATACCG	CCCCTCACCC	TCTTCA-CAA	GCCACCTCCA		CGGATAACTA		
<i>T. urogallus</i>	(AM902520)	TTAAGACGGC	CTTGGGGCAC	GTACATACCG	CCCCTCACCC	TCTTCA-TAG	GCCACAATA		ACAATAAATA		
<i>S. rusticola</i>	(AM902519)	TTAAACTGGC	CCTGGGGCAC	GTACATACCG	CCCCTCACCC	TCCTCA-CAG	GCTACAATCA		TC-ATAA-TA		
<i>C. palumbus</i>	(AM902521)	TTAAGCCGGC	CTTGGGGCAC	GTACATACCG	CCCCTCACCC	TCCTCA-TA	<b>GCT</b> CTAAAC-		-TACT-AAAT		
<i>T. philomelos</i>	(AM902522)	TTAAGCCGGC	CTTGGGGCAC	GTACATACCG	CCCCTCACCC	TCCTCA-TAA	GGCCGCAACA		-CACCCAATA		
<i>G. gallus</i>	(NC001323)	TTAAGACGGC	CTTGGGGCAC	GTACATACCG	CCCCTCACCC	TCTTCA-CAA	GCCATCAACA		TCAATAAATA		
<i>M. gallopavo</i>	(U83741)	TAAAGACGGC	CTTGGGGCAC	GTACATACCG	CCCCTCACCC	TCCTCA-CAA	<b>GCT</b> ATCAATT		TCATAAATA		
<i>C. moschata</i>	(AM902523)	TTAAGCCGGC	<b>CTA</b> GGGCAC	GTACATACCG	CCCCTCACCC	TCCTCA-CAA	GCCACACCCC		CACATAACTA		
<i>A. anser</i>	(AY164530)	TTAAGCCGGC	CCTGGGGCAC	GTACATACCG	CCCCTCACCC	TCCTCA-AAA	GCCACATCCC		-ACATAACTA		
		701	<b>BfaI</b> <b>AluI</b>				←12S-REV		757		
<i>C. coturnix</i>	(AM902516)	-ACACCCAAC	CATTAAAGCCA	AAGACGAGGT	AAGTCGTAAC	AAGGTAAGCA	TACTGGA				
<i>P. colchicus</i>	(AM902515)	-ATACC--CA	CATCAAGCCA	AAGACGAGGT	AAGTCGTAAC	AAGGTAAGCA	TACTGGA				
<i>A. rufa</i>	(AM902517)	-ATAC---CC	CCCCCGGCTA	AAGACGAGGT	AAGTCGTAAC	AAGGTAAGCA	TACTGGA				
<i>N. meleagris</i>	(AM902518)	-ATAC---CC	TCCCCGGCCA	AAGACGAGGT	AAGTCGTAAC	AAGGTAAGCA	TACTGGA				
<i>T. urogallus</i>	(AM902520)	-ATACTT-CC	CATAAAGCCA	AAGACGAGGT	AAGTCGTAAC	AAGGTAAGCA	TACTGGA				
<i>S. rusticola</i>	(AM902519)	CATAAATACGA	ATTAA <b>AGCTG</b> A	AAGACGAGGT	AAGTCGTAAC	AAGGTAAGCA	TACTGGA				
<i>C. palumbus</i>	(AM902521)	AATAAATACCC	CTATCCGCTA	AAGATGAGGT	AAGTCGTAAC	AAGGTAAGCA	TACTGGA				
<i>T. philomelos</i>	(AM902522)	CCTAATAAGCC	CATCC <b>AGCTA</b> A	AAGAGGAGGT	AAGTCGTAAC	AAGGTAAGCA	TACTGGA				
<i>G. gallus</i>	(NC001323)	TATACTTTCC	CTCCCGCTA	AAGACGAGGT	AAGTCGTAAC	AAGGTAAGTG	TACCGBA				
<i>M. gallopavo</i>	(U83741)	-ATACC--CA	ACC <b>CTAGCT</b> A	AAGATGAGGT	AAGTCGTAAC	AAGGTAAGCG	TACCGBA				
<i>C. moschata</i>	(AM902523)	-ATACC--CT	AAACATGCCA	AAGATGAGGT	AAGTCGTAAC	AAGGTAAGCA	TACTGGA				
<i>A. anser</i>	(AY164530)	-ATACC--AT	AAATACGTCT	AAGATGAGGT	AAGTCGTAAC	AAGGTAAGTG	TACCGBA				

Figure 1. (continued)



for the specific identification of meat from these bird species based on PCR-RFLP analysis of a conserved fragment from the mitochondrial 12S rRNA gene. The assay is also intended to enable the differentiation between these meats and those from domestic avian species.

## Experimental

### Sample Selection and DNA Extraction

Authentic muscle samples of quail, pheasant, red-legged partridge, guinea fowl, Eurasian woodcock, woodpigeon, and song thrush were provided by Antonio de Miguel (Madrid, Spain). Red-legged partridge samples were also obtained from the Estación Biológica de Doñana (Sevilla, Spain). Capercaillie meat samples were obtained from the Department of Animal Pathology (Facultad de Veterinaria, Universidad Autónoma de Barcelona, Spain). Chicken, turkey, Muscovy duck, and goose meat were purchased from local markets. A total of 15 individuals from each species were analyzed. All specimens were morphologically identified before obtaining the samples.

Fresh muscle portions from all selected specimens were processed immediately or stored frozen at  $-20^{\circ}\text{C}$  until use. Meat samples were also analyzed after being subjected to experimental sterilization at  $121^{\circ}\text{C}$  for 20 min.

Genomic DNA was extracted from meat using a Wizard DNA Clean-up System kit (Promega Corp., Madison, WI). The extraction was performed as follows: 0.2 g meat was homogenized with 860  $\mu\text{L}$  extraction buffer [10 mM Tris, pH 8.0; 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, and 1% sodium dodecyl sulfate (SDS)], 100  $\mu\text{L}$  5 M guanidine hydrochloride, and 40  $\mu\text{L}$  20 mg/mL proteinase K (Roche Applied Science, Painsberg, Germany). The samples were incubated overnight at  $55^{\circ}\text{C}$  with shaking at 60 rpm (C24KC, New Brunswick Scientific Co., Edison, NJ). After incubation, they were left to cool at room temperature. A 500  $\mu\text{L}$  volume of chloroform (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) was added to the lysate before centrifugation at  $10\,000 \times g$  for 10 min. The aqueous phase (500  $\mu\text{L}$ ) was carefully transferred to a fresh tube to purify the DNA using the Wizard DNA Clean-up System kit (Promega) with a vacuum manifold, according to the manufacturer's instructions. Finally, the DNA was eluted in 100  $\mu\text{L}$  sterile deionized water, and its concentration was determined by spectrophotometry at 260 nm.

### PCR Amplification of a Conserved 12S rRNA Gene Fragment from Game Bird Meat

The set of primers used for amplification consisted of 12S-FW and 12S-REV oligonucleotides (1):

12S-FW: 5'-GGTAAATCTCGTGCCAGCCA-3'  
12S-REV: 5'-TCCAGTATGCTTACCTTGTTACGAC-3'

They were designed for the amplification of an approximately 720 bp conserved fragment of the 12S rRNA gene for various avian and mammal species.

PCR amplification reactions were performed in a total volume of 25  $\mu\text{L}$ . Each reaction mixture contained 100 ng

template DNA, 2 mM  $\text{MgCl}_2$ , 200  $\mu\text{M}$  of each dNTP, 5 pmol of each primer, and 1 unit of *Tth* DNA polymerase (Biotools, Madrid, Spain) in a reaction buffer containing 75 mM Tris-HCl, pH 9.0; 50 mM KCl, 20 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , and 0.001% bovine serum albumin.

PCR amplification was performed in a Progene thermal cycler (Techne Ltd, Cambridge, UK). Forty cycles of amplification with the following step cycle profile were programmed: strand denaturation at  $93^{\circ}\text{C}$  for 30 s, primer annealing at  $65^{\circ}\text{C}$  for 30 s, and primer extension at  $72^{\circ}\text{C}$  for 45 s. An initial denaturation at  $93^{\circ}\text{C}$  for 2 min, and a final extension at  $72^{\circ}\text{C}$  for 5 min improved the product yield. PCR products (10  $\mu\text{L}$ ) were mixed with 2  $\mu\text{L}$  gel loading solution (Sigma), and loaded in a 2% D1 (Hispanlab S.A., Torrejón, Spain) agarose gel containing 1  $\mu\text{g/mL}$  ethidium bromide in Tris-acetate buffer (0.04 M Tris-acetate and 0.001 M EDTA, pH 8.0). Electrophoretic separation was performed at 100 V for 30 min. The resulting DNA fragments were visualized by UV transillumination and analyzed using a Geldoc 1000 UV Fluorescent Gel Documentation System-PC (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA).

### Sequencing of the PCR Products

PCR products (120  $\mu\text{L}$ ) amplified with 12S-FW and 12S-REV oligonucleotides from quail, pheasant, red-legged partridge, guinea fowl, capercaillie, Eurasian woodcock, woodpigeon, song thrush, and Muscovy duck meats were loaded in a 2% LM2 (Hispanlab) agarose gel containing 1  $\mu\text{g/mL}$  ethidium bromide in Tris-acetate buffer, and electrophoresed at 90 V for 40 min. Each DNA fragment was excised from the agarose gel under UV light using a sterile scalpel. The gel slice was purified with the QIAquick Gel Extraction kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions. The concentration of the PCR products was estimated by agarose gel electrophoresis using a standard as reference marker (REAL, Durviz S.L., Valencia, Spain). A Geldoc 1000 System-PC (Bio-Rad) was used for that purpose. Purified PCR products were sequenced at Sistemas Genómicos S.L. (Parque Tecnológico de Valencia, Spain). DNA sequencing was accomplished in an ABI Prism model 377 DNA sequencer (Perkin-Elmer/Applied Biosystems Division, Foster City, CA) using 12S-FW and 12S-REV primers with the dRhodamine Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit (Perkin-Elmer). The sequences obtained were submitted to Genbank/EMBL database and were assigned with accession numbers AM902515-523. Sequencing of PCR products from chicken, turkey, and goose was not necessary because of the high number of 12S rRNA sequences of these species available in the Genbank/EMBL database.

### Restriction Site Mapping and Enzymatic Digestion of the Amplified DNA Fragments

Alignment and restriction site mapping of 12S rRNA gene sequences obtained from quail (AM902516), pheasant (AM902515), red-legged partridge (AM902517), guinea fowl (AM902518), capercaillie (AM902520), Eurasian woodcock

**Table 1. Predicted fragment sizes of the partial 12S rRNA gene based on sequence map analysis**

	Quail	Pheasant	Red-legged partridge	Guinea fowl	Capercaillie	Eurasian woodcock	Woodpigeon	Song thrush	Chicken	Turkey	Muscovy duck	Goose
<i>AluI</i>	325	283	302	326	286	224	292	572	251	327	609	604
	203	276	178	282	276	112	238	90	153	209	120	94
	113	113	129	113	113	104	107	40	132	113		26
	75	27	108		41	99	73	22	77	40		
		18	5			55	10		51	33		
						54	5		40			
						40			22			
						17 (2)						
						10						
<i>BfaI</i>	389	267	390	228	231	399	395	331	397	351	191	387
	227	235	332	212	215	194	330	206	191	328	173	246
	88	127		181	182	72		132	90	43	164	91
	12	88		88	88	36		55	36		112	
				12		31			12		89	

(AM902519), woodpigeon (AM902521), song thrush (AM902522), chicken (NC001323), turkey (U83741), Muscovy duck (AM902523), and goose (AY164530) were performed using the EMBOSS software package, version 2.2.0. From the detailed comparison of the sequence maps, *AluI* and *BfaI* endonucleases (New England BioLabs, Beverly, MA) were selected for meat species identification.

Digestions were performed in a total volume of 20  $\mu$ L containing 100 ng amplified DNA, 10–12.5 units of enzyme, and 2  $\mu$ L 10X digestion buffer recommended by the manufacturer, and were incubated at the appropriate temperature of each endonuclease for 16 h. The resulting fragments were separated by electrophoresis in a 3.5% MS8 (Hispanlab) agarose gel at 70 V for 90 min. The sizes of the resulting DNA fragments were estimated by comparison with a commercial standard (Biomarker Low, BioVentures Inc., Murfreesboro, TN).

## Results and Discussion

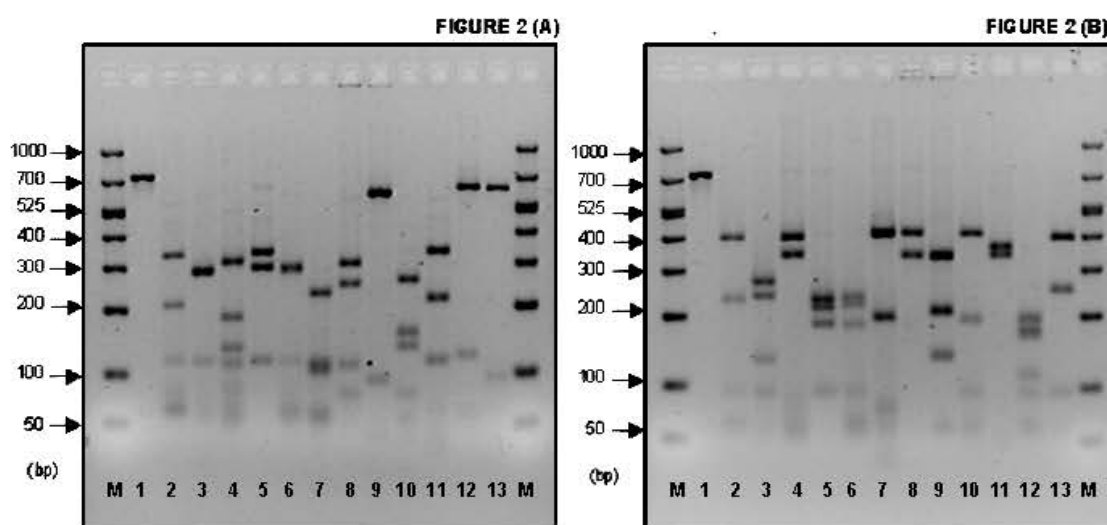
Development of a reliable method for differentiation of game bird species is needed to ensure authenticity of meat and meat products. PCR-RFLP has been proven to be a practical, simple, and rapid technique for species identification (15). The present study aimed to develop a PCR-RFLP technique for the specific identification of meats from quail, pheasant, red-legged partridge, guinea fowl, capercaillie, Eurasian woodcock, woodpigeon, and song thrush, targeting sequences of the 12S rRNA gene. The technique was also applied to the differentiation of these meats from those of chicken, turkey, Muscovy duck, and goose.

In this study, the mitochondrial 12S rRNA gene was used as a molecular marker for meat species identification because

it has a high number of copies per cell, an acceptable length, and its mutation rate induces substantial genetic interspecies variation facilitating identification of closely related species (16, 17). The mitochondrial primers 12S-FW and 12S-REV used in the PCR technique developed in this work, successfully amplified a conserved 720 base pair (bp) region from the 12S rRNA gene of all quail, pheasant, red-legged partridge, guinea fowl, capercaillie, Eurasian woodcock, woodpigeon, song thrush, chicken, turkey, Muscovy duck, and goose individuals analyzed (results not shown).

Following amplification, PCR-RFLP analysis to identify the origin of an unknown sample may be possible with the use of the appropriate restriction endonucleases (12). However, previous sequence data from authentic specimens are needed in order to provide species-specific reference restriction patterns. For that purpose, 12S PCR products from at least 2 individuals of each selected meat species were purified from the gel and sequenced. Restriction map analysis of the 12S rRNA gene sequences obtained from quail (AM902516), pheasant (AM902515), red-legged partridge (AM902517), guinea fowl (AM902518), capercaillie (AM902520), Eurasian woodcock (AM902519), woodpigeon (AM902521), song thrush (AM902522), and Muscovy duck (AM902523), together with Genbank/EMBL database sequences obtained from chicken (NC001323), turkey (U83741), and goose (AY164530), allowed the selection of *AluI* and *BfaI* endonucleases, as potential tools for the suitable identification of meats from the game bird species analyzed in this work (Figure 1). The cleavage patterns predicted from sequence map analysis are indicated in Table 1.

Results obtained following restriction analysis of 12S rRNA gene from quail, pheasant, red-legged partridge, guinea fowl, capercaillie, Eurasian woodcock, woodpigeon, song



**Figure 2.** Electrophoretic analysis (3.5% MS8 agarose) of the restriction fragments obtained from 12S rRNA gene PCR products digested with (A) *AluI* and (B) *BfaI* endonucleases. Samples are (1) undigested PCR product, (2) quail, (3) pheasant, (4) red-legged partridge, (5) guinea fowl, (6) capercaillie, (7) Eurasian woodcock, (8) woodpigeon, (9) song thrush, (10) chicken, (11) turkey, (12) Muscovy duck, and (13) goose. M, Molecular weight marker 50–1000 bp ladder (Biomarker® Low).

thrush, chicken, turkey, Muscovy duck, and goose after incubation with *AluI* and *BfaI* endonucleases are shown in Figure 2A and B, respectively. As can be deduced from the figures, the combined use of the 2 mentioned enzymes allowed the specific identification of the 12 species analyzed. Digestions performed with *AluI* endonuclease yielded different DNA banding profiles for quail, red-legged partridge, guinea fowl, Eurasian woodcock, woodpigeon, chicken, turkey, and Muscovy duck. Nevertheless, 12S rRNA gene digestions with this enzyme yielded a similar PCR-RFLP pattern in pheasant and capercaillie. The same problem appeared in song thrush and goose. Song thrush samples yielded visible fragments of 572 and 90 bp which could not be differentiated from the 2 visible fragments of 604 and 94 bp yielded in goose samples (Figure 2A). For this reason a combined PCR-RFLP technique with *BfaI* endonuclease had to be used (Figure 2B). The 3 restriction sites for this enzyme found in pheasant and capercaillie PCR products yielded 4 DNA fragments of 267, 235, 127, and 88 bp in pheasant, and 231, 215, 182, and 88 bp in capercaillie, which allowed the differentiation of these 2 species. For song thrush and goose samples, digestions performed with *BfaI* endonuclease resulted in 4 fragments of 331, 206, 132, and 55 bp in song thrush, whereas 2 restriction sites present in the goose sequence generated 3 DNA fragments of 387, 246, and 91 bp.

A number of small DNA fragments resulting from 12S rRNA gene digestions could not be detected after electrophoresis of the samples. However, the *AluI* and *BfaI* cleavage bands visualized in the gel were enough and suitable

for discrimination of the 12 species analyzed. In addition, the band sizes obtained by agarose gel electrophoresis after cleavage of PCR products with the 2 selected endonucleases were in agreement with the expected sizes for the restriction fragments inferred from sequence analysis.

The vast majority of PCR-RFLP studies published to date for meat species identification rely on the use of the mitochondrial cytochrome b gene (16, 18, 19). In contrast, considerably fewer studies have been reported about game bird authentication using PCR-RFLP with mitochondrial 12S rRNA gene as marker (20). Conserved restriction sites found for *AluI* and *BfaI* endonucleases among all quail, pheasant, red-legged partridge, guinea fowl, capercaillie, Eurasian woodcock, woodpigeon, song thrush, chicken, turkey, Muscovy duck, and goose 12S rRNA gene sequences, facilitated consistent and unequivocal species-specific identification. Fifteen specimens from each species were analyzed and results did not show intraspecific polymorphism, suggesting reproducibility of PCR-RFLP patterns with the use of the 2 selected endonucleases.

To check the influence of processing treatments on the suitability of the PCR-RFLP method developed in this work, heat-treated meats from each species were also assayed. However, PCR amplification of the 720 bp fragment could not be accomplished in these samples, possibly because thermal effect strongly accelerates DNA degradation from the samples and, consequently, amplification of particularly large DNA fragments such as 720 bp is impeded. Thus, PCR-RFLP based on the mitochondrial 12S rRNA fragment targeted cannot be

applied for species identification in thermally treated meats. In the analysis of food matrixes in which thermal action or other processing effects may degrade the DNA present in the food tissues, PCR using specific primers targeting short DNA fragments may be used as an alternative technique to PCR-RFLP for species identification (1).

### Conclusions

Our results indicate that PCR-RFLP of the mitochondrial 12S rRNA gene is a suitable alternative that can be applied to the detection of fraudulent or unintentional mislabeling of domestic and game bird meat species present in raw commercialized products. Compared to conventional methods, such as DNA sequencing, PCR-RFLP has been shown to be useful because it is accurate, simple, and inexpensive (21). Consequently, the PCR-RFLP technique developed in this study represents a rapid and efficient alternative method that could be used by meat industries as a tool to reveal fraud in the substitution of game bird meat products and to verify the correct labeling of game bird meats.

### Acknowledgments

This study was supported by Grant No. AGL 2007-60077 from the Ministerio de Educación y Ciencia of Spain and the *Programa de Vigilancia Sanitaria* S-0505/AGR/000265 from the Comunidad de Madrid (Spain). María Rojas is the recipient of a fellowship from the Ministerio de Educación y Ciencia (Spain).

We are indebted to Santiago Lavin González (Facultad de Veterinaria, Universidad Autónoma de Barcelona) and Juan José Negro Balmaseda (Estación Biológica de Doñana, Sevilla) for kindly supplying capercaillie and red-legged partridge samples.

### References

- (1) Fajardo, V., González, I., López-Calleja, I., Martín, I., Hernández, P.E., García, T., & Martín, R. (2006) *J. Agric. Food Chem.* **54**, 1144–1150
- (2) Wolf, C., Rentsch, J., & Hübner, P. (1999) *J. Agric. Food Chem.* **47**, 1350–1355
- (3) Saez, R., Sanz, Y., & Toldrá, F. (2004) *Meat Sci.* **66**, 659–665
- (4) Guoli, Z., Mingguang, Z., Zhijiang, Z., Hongsheng, O., & Qiang, L. (1999) *Meat Sci.* **51**, 233–236
- (5) Aida, A.A., Che Man, Y.B., Wong, C.M.V.L., Raha, A.R., & Son, R. (2005) *Meat Sci.* **69**, 47–52
- (6) Che Man, Y.B., Aida, A.A., Raha, A.R., & Son, R. (2007) *Food Control* **18**, 885–889
- (7) Calvo, J.H., Zaragoza, P., & Osta, R. (2001) *Poult. Sci.* **80**, 522–524
- (8) Girish, P.S., Anjaneyulu, A.S.R., Viswas, K.N., Anand, M., Rajkumar, N., Shivakumar, B.M., & Sharma, B. (2004) *Meat Sci.* **66**, 551–556
- (9) Colombo, F., Marchisio, E., Pizzini, A., & Cantoni, C. (2002) *Meat Sci.* **61**, 291–294
- (10) Martín, I., García, T., Fajardo, V., López-Calleja, I., Rojas, M., Hernández, P.E., González, I., & Martín, R. (2007) *Meat Sci.* **76**, 721–729
- (11) Verkaar, E.L.C., Nijman, I.J., Boutaga, K., & Lenstra, J.A. (2002) *Meat Sci.* **60**, 365–369
- (12) Fajardo, V., González, I., López-Calleja, I., Martín, I., Rojas, M., Pavón, M.A., Hernández, P.E., García, T., & Martín, R. (2007) *J. AOAC Int.* **90**, 179–186
- (13) Sun, Y.L., & Lin, C.S. (2003) *J. Agric. Food Chem.* **51**, 1771–1776
- (14) Partis, L., Croan, D., Guo, Z., Clark, R., Coldham, T., & Murby, J. (2000) *Meat Sci.* **54**, 369–376
- (15) Girish, P.S., Anjaneyulu, A.S.R., Viswas, K.N., Shivakumar, B.M., Anand, M., Patel, M., & Sharma, B. (2005) *Meat Sci.* **70**, 107–112
- (16) Bellagamba, F., Moretti, V.M., Comincini, S., & Valfrè, F. (2001) *J. Agric. Food Chem.* **49**, 3775–3781
- (17) Zhang, J., Huang, H., Cai, Z., & Huang, L. (2007) *Food Control* **18**, 1331–1336
- (18) Meyer, R., Hofelein, C., Luthy, J., & Candrian, U. (1995) *J. AOAC Int.* **78**, 1542–1551
- (19) Lanzilao, I., Burgalassi, F., Fancelli, S., Settimelli, M., & Fani, R. (2005) *J. AOAC Int.* **88**, 128–135
- (20) Girish, P.S., Anjaneyulu, A.S.R., Viswas, K.N., Santhosh, F.H., Bhilegaonkar, K.N., Agarwal, R.K., Kondaiah, N., & Nagappa, K. (2007) *Vet. Res. Commun.* **31**, 447–455
- (21) Wang, H.C., Lee, S.H., Chang, T.J., & Wong, M.L. (2004) *J. Vet. Med. Sci.* **66**, 855–859



## Identification of raw and heat-processed meats from game bird species by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism of the mitochondrial D-loop region

M. Rojas, I. González, V. Fajardo, I. Martín, P. E. Hernández, T. García, and R. Martín<sup>1</sup>

*Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense, 28040 Madrid, Spain*

**ABSTRACT** Polymerase chain reaction-RFLP analysis has been applied to the identification of meats from quail (*Coturnix coturnix*), pheasant (*Phasianus colchicus*), red-legged partridge (*Alectoris rufa*), chukar partridge (*Alectoris chukar*), guinea fowl (*Numida meleagris*), capercaillie (*Tetrao urogallus*), Eurasian woodcock (*Scolopax rusticola*), and woodpigeon (*Columba palumbus*). Polymerase chain reaction amplification was carried out using a set of primers flanking a conserved

region of approximately 310 bp from the mitochondrial D-loop region. Restriction site analysis based on sequence data from this DNA fragment permitted the selection of *Hinf*I, *Mbo*II, and *Hpy*188III endonucleases for species identification. The restriction profiles obtained when amplicons were digested with the chosen enzymes allowed the unequivocal identification of all game bird species analyzed. Consistent results were obtained with both raw and heat-processed meats.

**Key words:** game bird, species identification, D-loop region, polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism

2009 Poultry Science 88:669–679  
doi:10.3382/ps.2008-00261

## INTRODUCTION

In the last few years, traceability issues have grown in importance due to the consumers' increasing attention to food quality matters. Consumers are particularly worried about meat quality and its origin and integrity all through the food chain until consumption. (Arana et al., 2002; Dalvit et al., 2007). The increased awareness of consumers regarding the origin of an animal product has resulted in the need to verify the labeling statements (Mafra et al., 2007). In this sense, the European Union has applied, since 2005, strict legislation on labeling systems to guarantee meat traceability. It has been demonstrated that traceability methods based only on batch codes or paper documents cannot always be trusted because they can be easily counterfeited. All of these reasons have contributed to the need of developing different techniques to identify the animal origin of commercialized meats.

In this context, game bird meat is a susceptible target for fraudulent labeling due to the tremendous profit that results from selling less costly avian meat as meat from much more demanded and higher-priced species. Moreover, illegal trade of meat derived from game bird

species under protection may contribute not only to meat adulteration but also to severe depletion of biodiversity (Fajardo et al., 2007a). Each year, many protected game bird species are illegally killed for hunt trophies or human consumption as delicatessen in some restaurants. Therefore, there is a need for reliable and accurate methods for species identification in such varieties of meats. The development of these methods should protect both consumers and producers from frauds and would help to preserve game bird species against poaching or illegal trafficking (Teletchea et al., 2005; García and Arruga, 2006; Tejedor et al., 2007).

Numerous analytical methods based on protein analysis such as electrophoretic (Vallejo-Cordoba et al., 2005), chromatographic (Toorop et al., 1997) or immunological techniques (Rencova et al., 2000; Liu et al., 2006) have been developed to identify animal species in meat products. However, these methods often have a limited applicability for highly processed meats due to the protein denaturation. In contrast, DNA analytical methods offer a promising alternative for reliable species authentication even in heated meat samples because the thermal stability of DNA is much greater than that of proteins (Colgan et al., 2001; Hird et al., 2003; Dalmasso et al., 2004; Saez et al., 2004).

Most of the DNA-based methods used in the meat industry rely on the simplicity and sensitivity of the PCR (Peter et al., 2004). Polymerase chain reaction-based techniques most frequently used for meat spe-

©2009 Poultry Science Association Inc.

Received June 26, 2008.

Accepted November 12, 2008.

<sup>1</sup>Corresponding author: rmartins@vet.ucm.es



**Table 1.** Commercial meat products analyzed in this work

Type of product	Species labeled	Species detected
Stewed meat	Quail	Quail
Pickled meat	Quail	Quail
Pickled thighs (brand A)	Quail	Quail
Pickled thighs (brand B)	Quail	Quail
Boned pickled meat	Quail	Quail
Stewed meat (brand A)	Partridge	Chukar partridge
Stewed meat (brand B)	Partridge	Chukar partridge
Pickled meat (brand A)	Red-legged partridge	Red-legged partridge
Pickled meat (brand B)	Red-legged partridge	Red-legged partridge
Boned pickled meat	Red-legged partridge	Red-legged partridge
Stewed meat (brand A)	Pheasant	Pheasant
Stewed meat (brand B)	Pheasant	Pheasant
Stewed meat (brand C)	Pheasant	Pheasant
Pickled meat (brand A)	Pheasant	Pheasant
Pickled meat (brand B)	Pheasant	Pheasant
Stewed meat (brand A)	Guinea fowl	Guinea fowl
Stewed meat (brand B)	Guinea fowl	Guinea fowl
Stewed meat (brand C)	Guinea fowl	Guinea fowl
Pickled meat (brand A)	Guinea fowl	Guinea fowl
Pickled meat (brand B)	Guinea fowl	Guinea fowl

cies identification include PCR-nucleotide sequencing (Girish et al., 2004), PCR-random amplified polymorphic DNA (Calvo et al., 2001), PCR with species-specific primers (Colombo et al., 2002; Martín et al., 2007), or PCR-RFLP (Verkaar et al., 2002; Fajardo et al., 2007c). In particular, PCR-RFLP has special interest for meat speciation because it exploits the sequence variation that exists within defined DNA regions, allowing species differentiation of even closely related species by digestion of selected DNA fragments with appropriate restriction enzymes (Dooley et al., 2005; Fajardo et al., 2007b). Both nuclear and mitochondrial genes have been targeted for species detection by PCR-RFLP. Among mitochondrial genes, the cytochrome *b* (Verkaar et al., 2002; Santaclara et al., 2007), the 12S rRNA subunit (Girish et al., 2005; Fajardo et al., 2006; Saini et al., 2007; Zhang et al., 2007), and the D-loop region (Murray et al., 1995; Fajardo et al., 2007c) have been successfully applied for the identification of meat species such as cattle, sheep, goat, chicken, turkey, red deer, fallow deer, roe deer, chamois, pyrenean ibex, and mouflon. However, fewer studies have been published so far reporting the application of PCR-RFLP for game bird meat authentication (Girish et al., 2007).

The consumption of meat from game birds has gained increasing favor among consumers, who appreciate its texture and flavor as well as the low fat and cholesterol content (La Neve et al., 2008). In recent years, many popular game species are raised on carefully managed farms, which have contributed to an increase in the availability of this kind of meat. The main species produced on these types of farms are quail (*Coturnix coturnix*), pheasant (*Phasianus colchicus*), red-legged partridge (*Alectoris rufa*), chukar partridge (*Alectoris chukar*), and guinea fowl (*Numida meleagris*). Other important game bird species are Eurasian woodcock (*Scolopax rusticola*), woodpigeon (*Columba palumbus*), and capercaillie (*Tetrao urogallus*). In this sense, capercaillie is particularly important because it is a protected species in some countries, where hunting and

consumption of its meat is penalized by law (European Commission, 1979). In the present study, we describe a method for the specific identification of raw and heat-processed meats from game bird species based on PCR-RFLP analysis of a conserved fragment from the mitochondrial D-loop region. The assay is also intended to enable the differentiation between these meats and those from domestic avian species.

## MATERIALS AND METHODS

### Sample Selection and DNA Extraction

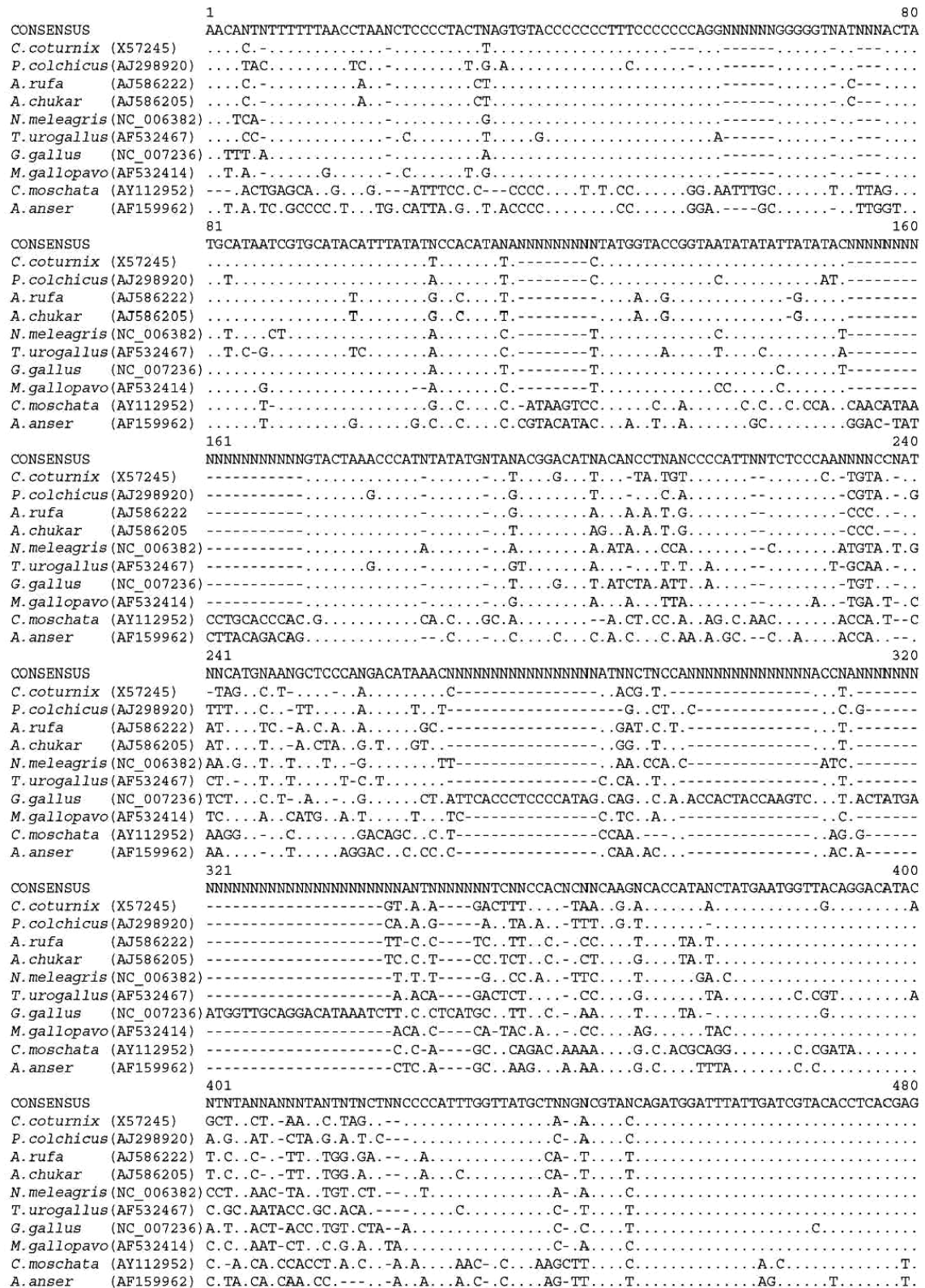
Authentic muscle samples of quail, pheasant, red-legged partridge, guinea fowl, Eurasian woodcock, and woodpigeon were provided by Antonio de Miguel (Madrid, Spain). Red-legged partridge samples were also obtained from the Estación Biológica de Doñana (Sevilla, Spain). Chukar partridge meat samples were provided by Hermanos Sainz (Madrid, Spain). Capercaillie meat samples were obtained from the Department of Animal Pathology (Facultad de Veterinaria, Universidad Autónoma de Barcelona, Spain). Chicken, turkey, muscovy duck, and goose meat samples were purchased from local markets (Madrid, Spain). A total of 15 individuals from each species were analyzed. All specimens were morphologically identified before obtaining the samples.

Fresh muscle portions from all selected specimens were processed immediately or stored frozen at  $-20^{\circ}\text{C}$  until use. Meat samples were also analyzed after being subjected to experimental sterilization ( $121^{\circ}\text{C}$  for 20 min) treatment. Several processed meat products from quail, partridge, pheasant, and guinea fowl were also obtained from different retail markets (Madrid, Spain) for their analysis (Table 1).

Genomic DNA was extracted from meat using a Wizard DNA Clean-Up System kit (Promega Corp., Madison, WI). The extraction was performed as follows: 0.2 g of meat was homogenized with 860  $\mu\text{L}$  of

## IDENTIFICATION OF GAME BIRD MEAT

671



**Figure 1.** Deoxyribonucleic acid sequence alignment of the mitochondrial D-loop region from quail (*Coturnix coturnix*, X57245), pheasant (*Phasianus colchicus*, AJ298929), red-legged partridge (*Alectoris rufa*, AJ586222), chukar partridge (*Alectoris chukar*, AJ586205), guinea fowl (*NNumida meleagris*, NC\_006382), capercaillie (*Tetrao urogallus*, AF532467), chicken (*Gallus gallus*, NC\_007236), turkey (*Meleagris gallopavo*, AF532414), muscovy duck (*Cairina moschata*, AY112952), and goose (*Anser anser*, AF159962) obtained from the GenBank-European Molecular Biology Laboratory database. Boldfaced and shaded nucleotides indicate the position of D-loopFW and D-loopREV conserved primers.



672

ROJAS ET AL.

	481	560
CONSENSUS	AGATCANCAACCCNCTGCCTGTAATGNTACTNCATGACTAGCTTCAGGCCCATTCNTTTCCCCCTACACCCCTCGCCCT	
<i>C. coturnix</i> (X57245)	.....C.....T.....C.T.C.G.....-.....	
<i>P. colchicus</i> (AJ298920)	.....C.....C.....C.....-.....	
<i>A. rufa</i> (AJ586222)	.....G.....C.....C.....-.....	
<i>A. chukar</i> (AJ586205)	.....C.....-.....C.....-.....	
<i>N. meleagris</i> (NC_006382)	.....G.....C.AT.....A.....	
<i>T. urogallus</i> (AF532467)	.....C.T.....CT.....	
<i>G. gallus</i> (NC_007236)	.....G.....T.....C.TC.....TA	
<i>M. gallopavo</i> (AF532414)	.....C.....A.....C.....TC	
<i>C. moschata</i> (AY112952)	.A...G...T...-T...A.A...-C.GATG...A.G...A...TC	
<i>A. anser</i> (AF159962)	.A...G...GT...A.A...-C.GGT...A.G...A...TC	
	561	640
CONSENSUS	CTTGCTCTTNNNTGCGCCTCTGGTTCCTCGGTACAGGNACATCCCATGATAACTCCTGANCTTNTCTACCTTTTCACGAAG	
<i>C. coturnix</i> (X57245)	.....C.....C.....A...CC.....A...T...	
<i>P. colchicus</i> (AJ298920)	.....A.....A.....-.....	
<i>A. rufa</i> (AJ586222)	.....C.....CT...T.....	
<i>A. chukar</i> (AJ586205)	.....C.....CT...T.....	
<i>N. meleagris</i> (NC_006382)	.....GC...A.CC...T.T.....TT.C.....	
<i>T. urogallus</i> (AF532467)	.....A.....T.....A...C.....	
<i>G. gallus</i> (NC_007236)	.....CT.CCACC.TA.....C.....A...T.....	
<i>M. gallopavo</i> (AF532414)	.....A.....A...C.....	
<i>C. moschata</i> (AY112952)	..CA.AT.....GC...AAT..GG.TCACT.ACCT...C...G.C...AAGT.	
<i>A. anser</i> (AF159962)	..CA.AT.....GC...AT..GG.TCACT.ACCT...C...TG.CC...AAGT.	
	641	720
CONSENSUS	TCATCTGTGCATTATNCTNCCCCTCTTCAGTCCGTGATCGCGCATCTTCCTNTCTNNNTGCTGTGTGTTCTCTNTNN	
<i>C. coturnix</i> (X57245)	.....G...C.G.....T.C.T.....-C.....T.C.--	
<i>P. colchicus</i> (AJ298920)	.....T...-.....CA.....C.....A...-.....T...--	
<i>A. rufa</i> (AJ586222)	.....G...C.G.....A.C.....-.....C...--	
<i>A. chukar</i> (AJ586205)	.....G...C.G.....T.....-.....C...--	
<i>N. meleagris</i> (NC_006382)	.....A.C...TT...T.....AT...T...--	
<i>T. urogallus</i> (AF532467)	.....T...-.....T.....A.C...A...-.....C...--	
<i>G. gallus</i> (NC_007236)	.....G...CT...T.....C...A...-.....TC...--	
<i>M. gallopavo</i> (AF532414)	.....G...C.A.....TAC...-A...-.....C...--	
<i>C. moschata</i> (AY112952)	G.....G.A..CTTC-.A..ATC..A.G..T.....CAG...T.TGGC..CTC.....T..AT	
<i>A. anser</i> (AF159962)	G.....G..CTT-.A..TC..A.G..A.....G...CAG...T.TGGC..CTC.....T..AT	
	721	800
CONSENSUS	NTTTTCTGGGGCTTCTTTCACAGGTGCGCCTTCACAGTGCNGTNGCNGGAGTNTANTCAAGTGAAGCCTGGACTACTCCT	
<i>C. coturnix</i> (X57245)	-C.C.T.....C...C.CA...C...C.....	
<i>P. colchicus</i> (AJ298920)	..C.....G.GT...G...T.....	
<i>A. rufa</i> (AJ586222)	.....G.GT...G...T.....A.....	
<i>A. chukar</i> (AJ586205)	.....A.....G...T...G...T.....A.....	
<i>N. meleagris</i> (NC_006382)	..C.....C.C.CA...C...C.....A...	
<i>T. urogallus</i> (AF532467)	.....G.GT...G...T.....	
<i>G. gallus</i> (NC_007236)	-C...T.....A.....G.GT...G...T.....A...	
<i>M. gallopavo</i> (AF532414)	.....G.....C.C.CA...A...C.....T.....	
<i>C. moschata</i> (AY112952)	T...C...T.A.C...C.G...C...ACT.C...G.A.A...-TCT...A...	
<i>A. anser</i> (AF159962)	T...C...T.A.C...G..TA...C...ATC.C...G.C.C...-TCT...A...	
	801	880
CONSENSUS	GCGTTGCGTCTATCTAGACCTCTCGTGCCCTCAATGAGACGGTTTGCCTGTATGGGGAATCAATTTGACACTGATG	
<i>C. coturnix</i> (X57245)	.....A.....G...T.....T...T.....	
<i>P. colchicus</i> (AJ298920)	.....T.....G.....T.....C.....	
<i>A. rufa</i> (AJ586222)	.....T.....T.....T.....	
<i>A. chukar</i> (AJ586205)	.....T.....T.....T.....	
<i>N. meleagris</i> (NC_006382)	.....T...T.....T.....T.....	
<i>T. urogallus</i> (AF532467)	.....C.T...A.....T.....	
<i>G. gallus</i> (NC_007236)	.....T.....G.....C.....	
<i>M. gallopavo</i> (AF532414)	.....T...C.....T...T...CC.....	
<i>C. moschata</i> (AY112952)	.....ATC.....T.T...AA.G..TA...G...A...T...C.....	
<i>A. anser</i> (AF159962)	..C.CA.G...T.T...AA.G..T...G...A...T...CC.....	
	← D-loopREV	960
CONSENSUS	CACCTTGGATCGCATTGTTATGGCTNNCTCCACCCCCCNGGTAANATGGTGCTATTAGTGAATGCTTGTGCGACA	
<i>C. coturnix</i> (X57245)	.....-C.AT...A.....C.....	
<i>P. colchicus</i> (AJ298920)	.....G.T...G...T.....	
<i>A. rufa</i> (AJ586222)	.....T...-G...G...A.....	
<i>A. chukar</i> (AJ586205)	.....T...-G...G...A.....	
<i>N. meleagris</i> (NC_006382)	.....T...C.C.GC...A.....	
<i>T. urogallus</i> (AF532467)	.....T.....C.....	
<i>G. gallus</i> (NC_007236)	.....T.....C.....	
<i>M. gallopavo</i> (AF532414)	.....T.....T.....	
<i>C. moschata</i> (AY112952)	.....C...CA...AT...CT.C...G.AG...T--T..TAG.A.G.T...C.AT...	
<i>A. anser</i> (AF159962)	.....C.A...CA...AT.T.A-.C...T..GG.T...A...G...GGA...C..T...	

Figure 1 (Continued). Electrophoretic analysis (3.5% MS8 agarose) of the restriction fragments obtained from the D-loop region PCR products of several commercial products from (A) quail, (B) pheasant, (C) partridge, and (D) guinea fowl. Samples correspond to restriction fragments generated with *Hinf*I (lines 2 to 6), *Mbo*II (lines 7 to 11), and *Hpy*188II (lines 12 to 16) endonucleases. In all images, line 1 corresponds to an undigested PCR product. M = molecular weight marker 50 to 1,000-bp ladder (Biomarker Low, BioVentures Inc., Murfreesboro, TN).

## IDENTIFICATION OF GAME BIRD MEAT

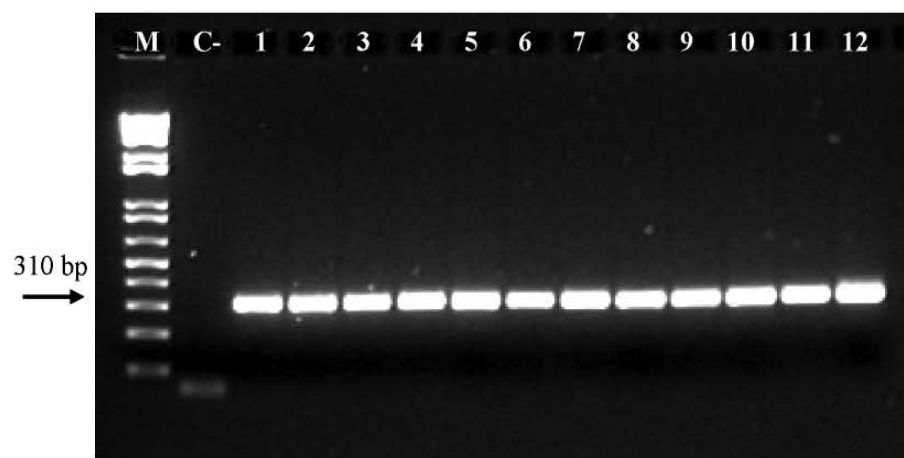
673

	961	1040
CONSENSUS	TATTTTANNNNCNAATTTTNNNNNCACTTCCTCTATTTTNCNNACAAAACNAGGAAATTTNCCACAANTTTT	
<i>C. coturnix</i> (X57245)	.....C.....T.TA.....T..G.G...T...T.....G.	
<i>P. colchicus</i> (AJ298920)	.....A.....CTCC.....T...G...A...T...C...	
<i>A. rufa</i> (AJ586222)	.....C.T.....T.CC.....C..G...C...AAA.....	
<i>A. chukar</i> (AJ586205)	.....C.T.....A...T.CC.....C..G...C...A.....	
<i>N. meleagris</i> (NC_006382)	.G.....TC.....CTTC.....C..A...C...T...A...C	
<i>T. urogallus</i> (AF532467)	.....A.....C.TA.....T...G...CT...A.....	
<i>G. gallus</i> (NC_007236)	.....TC.....CTTC.....T.....CA...T...C...	
<i>M. gallopavo</i> (AF532414)	.....G----T.....C.CA.....C.....AC...TT.....	
<i>C. moschata</i> (AY112952)	.....CC..AAAA.....CGACCCCC	
<i>A. anser</i> (AF159962)	.GCACA.AACAA.A...CA.TAGGCG..A.C...GCGC..CA.AA..T...C..T...C..T...T.ACCACCA.C.	
	1041	1120
CONSENSUS	NTTTTNTTNTTATTTTNTTNNNNNNNAAAAACATTTTAAAAAACTAANNATTACANNNAACACTNACGCATATAA	
<i>C. coturnix</i> (X57245)	T.G...G...A.....TGTTTTT.....TAC...C.....C...	
<i>P. colchicus</i> (AJ298920)	AG...G.T.....AAA.....A.....CTA...T.....	
<i>A. rufa</i> (AJ586222)	G...G...A.....ATTTTTT.....A...A..TAT.....	
<i>A. chukar</i> (AJ586205)	G...G...A.....ATTTTTT.....A...A..TAT.....G.....	
<i>N. meleagris</i> (NC_006382)	G.....C...A.....G.....AA..TT.....AAC...TC..A.A.C.T..	
<i>T. urogallus</i> (AF532467)	A.....T.....A.CTA.....G...	
<i>G. gallus</i> (NC_007236)	G..A.....A.....TATTTTTT.....TAC.....	
<i>M. gallopavo</i> (AF532414)	A.....A.....TATTTTTT.....TTT...T.C.....	
<i>C. moschata</i> (AY112952)	-----CCCC-----CC-----C-----A-----	
<i>A. anser</i> (AF159962)	AG.A.AA----.CC..C-----CC..CCAA.CC.GC.....C-----CCTA.....ATTA.TC	
	1121	1200
CONSENSUS	NANCCNCAAACNANAANNAACGTTTNNNGTNTANNTATATATANATNTNTNTNTANCANNNTTATTAGAGAAACT	
<i>C. coturnix</i> (X57245)	T.C..T.....C.C.....TAC..T..G.....C...-G..ACG.T..-T.TAA.....	
<i>P. colchicus</i> (AJ298920)	A.C..C.....C.T.G--.....GA.TGC-G.....T...-G..A.A.GC.A..CTT.....	
<i>A. rufa</i> (AJ586222)	T.T..T.....T.C.....-AT.CG..-G.....C...-G..G.A.T..A..ACAC.....	
<i>A. chukar</i> (AJ586205)	T.T..T.....TT.C.....A...-AT.CG..-G.....C...-G..G.A.T..A..ACAC.....	
<i>N. meleagris</i> (NC_006382)	C.T..A.....C.T..TT.....A..A.....T.CA.CA..ACT.TAGC.CAAA.....C	
<i>T. urogallus</i> (AF532467)	A.T.TA...TCGT...-T..T..G.....T...-G..G.T.A..C..TTT.....T...	
<i>G. gallus</i> (NC_007236)	ATC..T.....T.T.C--.....ATC..A..A.....C...-A..G.T.A.TCT.TCA.....	
<i>M. gallopavo</i> (AF532414)	ACC..A.....A.T.....C.T..A.....C.T..A..T..T.T.GCT.TTT.....C	
<i>C. moschata</i> (AY112952)	-----A.C.T-----ATA.A..TACG...C.T....ACGA.A.GA.C..AAT.....	
<i>A. anser</i> (AF159962)	ATC..TTCC.TG.C.TC-.TCG.AACGAT..A..TA...C.A.C..CATACAAA.AACTT.AAC.....	
	1201	1280
CONSENSUS	CCACTACCAAANNNAACATNAAAAANAACAANANATNACNNCNCATAAANCCCCNNNNNNNNNNAACAAACNAANATT	
<i>C. coturnix</i> (X57245)	.....G..ACA.....C.....A--CT.TT-.CG.....CTT.....T.T...	
<i>P. colchicus</i> (AJ298920)	.....TTC.CTT.TTT.....A..TT.T..TATAGG.C...A.....TT...C...	
<i>A. rufa</i> (AJ586222)	.....C..CCA.....T.....ATT.CC...AG..C...A.....T.C...	
<i>A. chukar</i> (AJ586205)	.....G..C..C-A.....C.....ATA.CC...AC..C.....T.C...	
<i>N. meleagris</i> (NC_006382)	.....C.ACAT...C.....ATG.AT.A..A..CCTCAT...C...CAAACCAATC...T..C..C	
<i>T. urogallus</i> (AF532467)	.....G..CG.TGC.T..T...T.A..C..A..GG.....A.....C..T...	
<i>G. gallus</i> (NC_007236)	.....ACC.T...-T...C.....TTT.C-.TG-.CA.T...CT...T-----C.....TCG...	
<i>M. gallopavo</i> (AF532414)	..C.....CCT.T..TCCT.....A..TG.A-AG..C...A.T.....G.....C...	
<i>C. moschata</i> (AY112952)	..G..T.....GCGT..TCT..G.C...-AT-TA.T.C..C.....G.....	
<i>A. anser</i> (AF159962)	..G..T.....T.GT...C.C...G.T...TT.ATATATT.C.-CT.T-----T-----CC	
	1281	1331
CONSENSUS	ATTTATATTNTTAATTANCAACANNNNNATTNCCTNCNACCANNANNNN	
<i>C. coturnix</i> (X57245)	.....G.....T.....TTTA.T.CC.T.GA.A--	
<i>P. colchicus</i> (AJ298920)	.....CA.G..A.A...T.GTTAA...T...A.CTT..AT----	
<i>A. rufa</i> (AJ586222)	.....G.....A.A.T.C..TGCT.AA--	
<i>A. chukar</i> (AJ586205)	.....G.....C.A...T.C...GCT.AA--	
<i>N. meleagris</i> (NC_006382)	.....CA.C..CA.A.....GCTCA...A..A.C...G----	
<i>T. urogallus</i> (AF532467)	.....G...A.TA...T.AATGA...T...A.T.T..AC----	
<i>G. gallus</i> (NC_007236)	.....G.....G.....CA-AA.CC.G...T.T...CT.TAAA	
<i>M. gallopavo</i> (AF532414)	.....AAC...A.....GCTAA...T...A.T...AC----	
<i>C. moschata</i> (AY112952)	.CCC.-..A.C.-CC.G.C.C-----CCG.T-----	
<i>A. anser</i> (AF159962)	.C.C.-.C.A.C.GC..A.C.C-----C.C.G.C-----	

Figure 1 (Continued). Electrophoretic analysis (3.5% MS8 agarose) of the restriction fragments obtained from the D-loop region PCR products of several commercial products from (A) quail, (B) pheasant, (C) partridge, and (D) guinea fowl. Samples correspond to restriction fragments generated with *Hinf*I (lines 2 to 6), *Mbo*II (lines 7 to 11), and *Hpy*18III (lines 12 to 16) endonucleases. In all images, line 1 corresponds to an undigested PCR product. M = molecular weight marker 50 to 1,000-bp ladder (Biomarker Low, BioVentures Inc., Murfreesboro, TN).

extraction buffer (10 mM Tris, pH 8.0; 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, and 1% SDS), 100  $\mu$ L of 5 M guanidine-hydrochloride, and 40  $\mu$ L of 20 mg/mL of proteinase K (Roche Applied Science, Pensberg, Germany). The samples were incubated overnight at 55°C with shaking at 60 rpm (C24KC, New Brunswick Scientific Co.,

Edison, NJ). After incubation, they were left to cool at room temperature. Five hundred microliters of chloroform (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) was added to the lysate before centrifugation at 10,000  $\times g$  for 10 min. The aqueous phase (500  $\mu$ L) was carefully transferred to a fresh tube to purify the DNA using the Wiz-



**Figure 2.** Electrophoretic analysis of the conserved D-loop region PCR products obtained from (1) quail, (2) pheasant, (3) red-legged partridge, (4) chukar partridge, (5) guinea fowl, (6) capercaillie, (7) Eurasian woodcock, (8) woodpigeon, (9) chicken, (10) turkey, (11) muscovy duck, and (12) goose raw meats using D-loopFW and D-loopREV primers. M = molecular weight marker 1 kb plus DNA ladder (GibcoBRL, Invitrogen Corp., Carlsbad, CA); C = negative control.

ard DNA Clean-Up System kit (Promega Corp.) with a vacuum manifold, according to the manufacturer's instructions. Finally, the DNA was eluted in 100  $\mu$ L of sterile deionized water, and its concentration was determined by spectrophotometry at 260 nm.

### PCR Amplification of a Conserved D-Loop Region Fragment from Game Bird Meat

The set of primers used for amplification consisted of D-loopFW and D-loopREV oligonucleotides:

D-loopFW: 5'-TTGCGCCTCTGTTTCCT-3'

D-loopREV: 5'-GAGACAAAGTGCATCAGTGTCAA-3'.

They were designed for the amplification of a conserved fragment from the D-loop region, based on sequences available in the GenBank-European Molecular Biology Laboratory database for quail (accession number X57245), pheasant (AJ298920), red-legged partridge (AJ586222), chukar partridge (AJ586205), guinea fowl (NC\_006382), capercaillie (AF532467), chicken (NC\_007236), turkey (AF532414), muscovy duck (AY112952), and goose (AF159962). The EMBOSS software package, version 2.2.0, and Primer Express 2.0 software (Perkin-Elmer/Applied Biosystems Division, Foster City, CA) were used for primer design. The database sequences multialignment and the position of the conserved primers are shown in Figure 1. This set of primers was expected to produce amplicons of approximately 310 bp in the 12 meat species analyzed in this work.

Polymerase chain reaction amplification reactions were performed in a total volume of 25  $\mu$ L. Each reaction mixture contained 100 ng of template DNA, 2 mM  $MgCl_2$ , 200  $\mu$ M of each deoxynucleoside triphosphate, 25 pmol of each primer, and 1 unit of *Tth* DNA polymerase (Biotools, Madrid, Spain) in a reaction buffer

containing 75 mM Tris-HCl, pH 9.0; 50 mM KCl; 20 mM  $(NH_4)_2 SO_4$ ; and 0.001% BSA.

Polymerase chain reaction amplification was carried out in a Progene thermal cycler (Techne Ltd., Cambridge, UK). Forty cycles of amplification with the following step cycle profile were programmed: strand denaturation at 93°C for 30 s, primer annealing at 50°C for 30 s, and primer extension at 72°C for 45 s. An initial denaturation at 93°C for 2 min and a final extension at 72°C for 5 min improved the product yield. The PCR products (10  $\mu$ L) were mixed with 2  $\mu$ L of gel loading solution (Sigma-Aldrich) and loaded in a 2% D1 Low EEO (Hispanlab S.A., Torrejón, Spain) agarose gel containing 1  $\mu$ g/mL of ethidium bromide in Tris-acetate buffer (0.04 M Tris-acetate and 0.001 M EDTA, pH 8.0). Electrophoretic separation was performed at 100 V for 30 min. The resulting DNA fragments were visualized by UV transillumination and analyzed using a Geldoc 1000 UV Fluorescent Gel Documentation System-PC (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA).

### Sequencing of the PCR Products

Polymerase chain reaction products (120  $\mu$ L) amplified with D-loopFW and D-loopREV oligonucleotides from quail, pheasant, red-legged partridge, chukar partridge, guinea fowl, capercaillie, Eurasian woodcock, woodpigeon, chicken, turkey, and muscovy duck meats were loaded in a 2% LM2 (Hispanlab S. A.) agarose gel containing 1  $\mu$ g/mL of ethidium bromide in Tris-acetate buffer and electrophoresed at 90 V for 40 min. Each DNA fragment was excised from the agarose gel under UV light using a sterile scalpel. The gel slice was purified with the QIAquick Gel Extraction kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions. The concentration of the PCR products was estimated by agarose gel electro-

## IDENTIFICATION OF GAME BIRD MEAT

675

		1	D-loopFW →	Hpy188III		Hpy188IIIMboII	MboII	Hpy188III
C.coturnix	(FM164774)	TTGCGCCTCT	GGTTCTCTCGG	TCAGGCGCAT	CCCCCGGATA	ACTATCGGAC	TTTCTCACTT	TTCACGAAGT
P.colchicus	(FM164775)	TTGCGCCTCT	GGTTCTCTCGG	TCAGGAACAT	CCCATGCATA	ACTCCTGAAC	TT-CTCACTT	TTCACGAAGT
A.rufa	(FM164776)	TTGCGCCTCT	GGTTCTCTCGG	TCAGGCACAT	CCCATGCATA	ACTCCTGACT	TTTCTCACTT	TTCACGAAGT
A.chukar	(FM164777)	TTGCGCCTCT	GGTTCTCTCGG	TCAGGCACAT	CCCATGCATA	ACTCCTGACT	TTTCTCACTT	TTCACGAAGT
N.meleagris	(FM164778)	TTGCGCCTCT	GGTTCTCTCGG	TCAGGGCCAT	CACCCGCTTT	ACTCCTGATT	TC-CTCACTT	TTCACGAAGT
T.urogallus	(FM164779)	TTGCGCCTCT	GGTTCTCTCGG	TCAGGAACAT	CCCATGCTTA	ACTCCTGAAC	TC-CTCACTT	TTCACGAAGT
s.rusticola	(FM164780)	TTGCGCCTCT	GGTTCTCTATG	TCAGGGCCAT	-AAACGGATT	GATACTCA--	TAACCTTGCTC	TTTACGAATA
C.palumbus	(FM164781)	TTGCGCCTCT	GGTTCTCTATG	TCAGGGCCAT	AAGCTTGCCA	AATCCCATGA	C--CTCGCTC	TTACAGAGTA
G.gallus	(FM164782)	TTGCGCCTCT	GGTTCTCTCGG	TCAGGCACAT	CCCATGCATA	ACTCCTGAAC	TTTCTCACTT	TTCACGAAGT
M.gallopavo	(FM164783)	TTGCGCCTCT	GGTTCTCTCGG	TCAGGAACAT	CCCATGCATA	ACTCCTGAAC	TC-CTCACTT	TTCACGAAGT
C.moschata	(FM164784)	TTGCGCCTCT	GGTTCTCTCGG	TCAGGGCCAT	CAATTGGGTT	CACCTACCCT	TTCTCTCGCT	TTCAAAGTGG
A.anser	(FM164785)	TTGCGCCTCT	GGTTCTCTCGG	TCAGGGCCAT	CCATTGGGTT	CACCTACCCC	T-CCTTGCCC	TTCAAAGTGG
		71	MboII	MboII		MboII	MboII	140
C.coturnix	(FM164774)	CATCTG-T--	GCATTATCTT	GCCCTCTCTC	AGTCCGTGAT	CGCGGCATTT	CCTTTCTTTC	TC-TGCTGTT
P.colchicus	(FM164775)	CATCTG-T--	GCATTATCTT	-CCCTCTCA	AGTCCGTGAT	CGCGGCATCT	TCTCTCTTTC	AT-TGCTGTT
A.rufa	(FM164776)	CATCTG-T--	GCATTATCTT	GCCCTCTCTC	AGTCCGTGAT	CGCGGCATCT	TATCTCTTTC	TT-TGCTGTT
A.chukar	(FM164777)	CATCTG-T--	GCATTATCTT	GCCCTCTCTC	AGTCCGTGAT	CGCGGCATCT	TCTTTCTTTC	TT-TGCTGTT
N.meleagris	(FM164778)	CATCTG-G--	GAATCATTTT	-CCCTCTTTC	AGTCCGTGAT	CGCGGCATCT	TCTTTCTTCA	TT-TGCTGTT
T.urogallus	(FM164779)	CATCTGGT--	GCATTATCTT	-CCCTCTTTC	AGTCCGTGAT	CGCGGCATCT	TATCTCTTTC	AT-TGCTGTT
s.rusticola	(FM164780)	CATCTGGT--	TCGCTATATG	-CCCCCTTC	AGTCCGTGAT	CGCGGCATTC	TACAATTCT-	-AATACATCT
C.palumbus	(FM164781)	CATCTGGTCTG	GGGTTCATAC	TCACCATTTT	AGTCCGTGAT	CGCGGCATTC	CCCCGACCT-	TGGCGCCTTT
G.gallus	(FM164782)	CATCTG-T--	GGATTATCTT	-CCCTCTTTC	AGTCCGTGAT	CGCGGCATCT	TCTCTCTTCT	AT-TGCTGTT
M.gallopavo	(FM164783)	CATCTG-T--	GCATTATCTT	ACCCCTCTTC	AGTCCGTGAT	CGCGGCATCT	TTACTCTTTC	TA-TGCTGTT
C.moschata	(FM164784)	CATCTG-T--	GGAATACTTC	-CACCATCTC	AATGCGTTAT	CGCGGCATCT	TCCAGCTTTT	TGGCGCCTCT
A.anser	(FM164785)	CATCTG-T--	G-AGTACTTT	-CACCTTCTC	AATGCGTAA	CGCGGCATCT	TCCAGCTTTT	TGGCGCCTCT
		141MboII	MboII	MboII		MboII	HinfI	210
C.coturnix	(FM164774)	GGTTCTTCTT	---CTCTTTG	GGGCTTCTTC	ACAGGTTGCC	CTTCACAGTG	CCGTCGCCA	G AGTCTACTC
P.colchicus	(FM164775)	GGTTCTTCTT	---TTCTCTG	GGGCTTCTTC	ACAGGTTGCC	CTTCACAGTG	CGGGTGC-GG	AGTGTATTTC
A.rufa	(FM164776)	GGTTCTCTCT	---TTTTCTG	GGGCTTCTTC	ACAGGTTGCC	CTTCACAGTG	CGGGTGC-GG	AGTGTATTTC
A.chukar	(FM164777)	GGTTCTCTCT	---TTTTCTG	GGGCTTCTTC	ACAGGTTGCC	CTTCACAGTG	CGGTGTC-GG	AGTGTATTTC
N.meleagris	(FM164778)	GGTTCTTCTT	---TTCTCTG	GGGCTTCTTC	ACAGGTTGCC	CTTCACAGTG	CCGTGCCCA	G AGTCTACTC
T.urogallus	(FM164779)	GGTTCTCTCT	---TTTTCTG	GGGCTTCTTC	ACAGGTTGCC	CTTCACAGTG	CGGGTGC-GG	AGTGTATTTC
s.rusticola	(FM164780)	GGTTCTTCTT	---TTTCTCTG	GGG--TCTTC	--AACTTACC	CTCC--GGTG	CAGC-----	GGTGA-ATAC
C.palumbus	(FM164781)	GGTTTTTTTTT	---CTCTCT-	---CTCTCCC	GCAGCTCGCC	CCTCA-AGTG	CGCGGGGTAA	ATTGGTTTAT
G.gallus	(FM164782)	GGTTCTCTCT	---CTTTTTG	GGGCTTCTTC	ACAGGTTGCC	CTTCACAGTG	CGGGTGC-GG	AGTGTATTTC
M.gallopavo	(FM164783)	GGTTCTCTCT	---TTTTCTG	GGGCTTCTTC	ACAGGTTGCC	CTTCACAGTG	CCGTGCCCA	AGTACTACTC
C.moschata	(FM164784)	GGTTCTCTTT	ATTTTTTCCG	GGGTTTACCTC	ACAGCTGGCC	CTTCCCATCT	ACTTCG--GG	GGTCCCA--C
A.anser	(FM164785)	GGTTCTCTCT	ATTTTTTCCG	GGGTTTACCTC	ACAGGTTGCC	ATTCCCATCT	ATCTCG--GG	GGTCCCA--C
		211			Hpy188III			280
C.coturnix	(FM164774)	AAGTGAAG-C	CTGGACTACT	CCTGCGTTG-	CGTCCT-ATC	CTAGACCTCT	AGTGTCCCTC	GATGATACGG
P.colchicus	(FM164775)	AAGTGAAG-C	CTGGACTACT	CCTGCGTTG-	CGTCCT-ATC	CTAGTCTCTT	CGTGTCCCTC	GATGAGACGG
A.rufa	(FM164776)	AAGTGAAG-C	CAGGACTACT	CCTGCGTTG-	CGTCCT-ATT	CTAGACCTCT	CGTGTCCCTC	AATGAGACGG
A.chukar	(FM164777)	AAGTGAAG-C	CAGGACTACT	CCTGCGTTG-	CGTCCT-ATC	CTAGATCTCT	CGTGTCCCTC	AATGAGACGG
N.meleagris	(FM164778)	AAGTGAAG-C	CTGGACTACA	CCTGCGTTG-	CGTCCT-ATT	CTAGTCTCTT	CGTGTCCCTC	AATGATACGG
T.urogallus	(FM164779)	AAGTGAAG-C	CTGGACTACT	CCTGCGTTG-	CGTCCT-ATC	CTAGCCTCTT	AGTGTCCCTC	AATGAGACGG
s.rusticola	(FM164780)	AATCTAAGAC	TTGAGCATCT	CGTGCGTTT-	CGCTCTTATT	TTGGTCTCTA	GGCGTTGATT	AATGAGACGG
C.palumbus	(FM164781)	ATTCTGCA-C	CTAAATTA--	--TGCCTGA-	CCAACT-AAT	CTCGACCTCA	GGTACT-ATT	GGCGTTACGG
G.gallus	(FM164782)	AAGTGAAG-C	CTGGACTACA	CCTGCGTTG-	CGTCCT-ATC	CTAGTCTCTT	CGTGTCCCTC	GATGAGACGG
M.gallopavo	(FM164783)	AAGTGAAG-C	CTGGATTACT	CCTGCGTTG-	CGTCCT-ATC	CTAGATCTCC	CGTGTCCCTC	AATGAGACGG
C.moschata	(FM164784)	AATCTAAG-C	CTGGAC-ACA	CCTGCGTTT	CGTCCT-ATC	CTATATCTCA	AGGGTTACTC	AATGAGACGG
A.anser	(FM164785)	AATCTAAG-C	CTGGAC-ACA	CCTGCCCTA-	CGGCCT-ATC	CTGTATTTCA	AGGGTCCCTC	GATGAGACGG
		281	HinfI	Hpy188III	← D-loopREV	327		
C.coturnix	(FM164774)	T-TTGCGTGT	ATTGGGTATC	ATTTTGACAC	TGATGCACCTT	TGTCTC		
P.colchicus	(FM164775)	T-TTGCGTGT	ATGGGGAAATC	ATCTTGACAC	TGATGCACCTT	TGTCTC		
A.rufa	(FM164776)	T-TTGCGTGT	ATGGGGAAATC	ATTTTGACAC	TGATGCACCTT	TGTCTC		
A.chukar	(FM164777)	T-TTGCGTGT	ATGGGGAAATC	ATTTTGACAC	TGATGCACCTT	TGTCTC		
N.meleagris	(FM164778)	T-TTGCGTGT	ATGGGGAAATC	ATTTTGACAC	TGATGCACCTT	TGTCTC		
T.urogallus	(FM164779)	T-TTGCGTGT	ATGGGGAAATC	ATTTTGACAC	TGATGCACCTT	TGTCTC		
s.rusticola	(FM164780)	TGTCAAGTGT	TTGGGGAAATC	ATATTGACAC	TGATGCACCTT	TGTCTC		
C.palumbus	(FM164781)	G-TTAAAGAT	ATCCGGTATC	ACCTTGACAC	TGATGCACCTT	TGTCTC		
G.gallus	(FM164782)	T-TTGCGTGT	ATGGGGAAATC	ATCTTGACAC	TGATGCACCTT	TGTCTC		
M.gallopavo	(FM164783)	T-TTGCGTGT	ATGTGGTATC	ACCTTGACAC	TGATGCACCTT	TGTCTC		
C.moschata	(FM164784)	T-TGGCGTAT	ATGGGGTATC	ATCTTGACAC	TGATGCACCTT	TGTCTC		
A.anser	(FM164785)	T-TGGCGTAT	ATGGGGAAATC	ATCTTGACAC	TGATGCACCTT	TGTCTC		

Figure 3. Deoxyribonucleic acid sequences from part of the mitochondrial D-loop region of quail (*Coturnix coturnix*, FM164774), pheasant (*Phasianus colchicus*, FM164775), red-legged partridge (*Alectoris rufa*, FM164776), chukar partridge (*Alectoris chukar*, FM164777), guinea fowl (*Nunida meleagris*, FM164778), capercaillie (*Tetrao urogallus*, FM164779), Eurasian woodcock (*Scolopax rusticola*, FM164780), woodpigeon (*Columba palumbus*, FM164781), chicken (*Gallus gallus*, FM164782), turkey (*Meleagris gallopavo*, FM164783), muscovy duck (*Cairina moschata*, FM164784), and goose (*Anser anser*, FM164785). Restriction sites for *HinfI*, *MboII*, and *Hpy188III* are shaded. Boldfaced and highlighted nucleotides indicate the position of primers D-loopFW and D-loopREV used for PCR amplification.

phoresis using a standard as reference marker (REAL, Durviz S.L., Valencia, Spain). Purified PCR products were sequenced at Sistemas Genómicos S.L. (Parque Tecnológico de Valencia, Spain). Deoxyribonucleic acid sequencing was accomplished in an ABI Prism model 377 DNA sequencer (Perkin-Elmer/Applied Biosystems) using D-loopFW and D-loopREV primers with the dRhodamine Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit (Perkin-Elmer/Applied Biosystems). The sequences obtained were submitted to GenBank-European Molecular Biology Laboratory database and were assigned with accession numbers FM164774-85.

### Restriction Site Mapping and Enzymatic Digestion of the Amplified DNA Fragments

Alignment and restriction site mapping of D-loop region sequences obtained from quail (FM164774), pheasant (FM164775), red-legged partridge (FM164776), chukar partridge (FM164777), guinea fowl (FM164778), capercaillie (FM164779), Eurasian woodcock (FM164780), woodpigeon (FM164781), chicken (FM164782), turkey (FM164783), muscovy duck (FM164784), and goose (FM164785) were performed using the EMBOSS software package, version 2.2.0. From the detailed comparison of the sequence maps, *Hinf*I, *Mbo*II, and *Hpy*188III endonucleases (New England BioLabs, Beverly, MA) were selected for meat species identification.

Digestions were performed in a total volume of 20  $\mu$ L containing 100 ng of amplified DNA, 10 units of enzyme, and 2  $\mu$ L of 10 $\times$  digestion buffer recommended by the manufacturer, and were incubated at 37°C for 16 h. The resulting fragments were separated by electrophoresis in a 3.5% MS8 (Hispanlab S. A.) agarose gel at 70 V for 90 min. The sizes of the resulting DNA fragments were estimated by comparison with a commercial standard (Biomarker Low, BioVentures Inc., Murfreesboro, TN).

## RESULTS AND DISCUSSION

Molecular techniques developed over the last 2 decades have allowed the identification of animal species in raw or processed meat products to protect consumers

from fraud (Martín et al., 2007). Among DNA-based techniques, PCR-RFLP offers the advantages of being simpler, cheaper, and easily adaptable for routine large-scale studies such as those required in inspection programs (Fajardo et al., 2007b). The present study aimed to develop a PCR-RFLP technique for the specific identification of meats from quail, pheasant, red-legged partridge, chukar partridge, guinea fowl, capercaillie, Eurasian woodcock, and woodpigeon targeting sequences of the mitochondrial D-loop region. The technique was also applied to the differentiation of these meats from those of chicken, turkey, muscovy duck, and goose.

Many PCR-based assays for meat species identification use DNA targets in the mitochondrial genome because of the high copy number of small, circular mitochondrial DNA in cells. A higher copy number of mitochondrial DNA ensures a sufficiently high quantity of PCR product even in the case of samples undergoing intense DNA fragmentation due to severe processing conditions (Pascoal et al., 2005). In addition, mitochondrial DNA evolves much faster than nuclear DNA and thus contains more sequence diversity, thereby facilitating the identification of closely related species (Wolf et al., 2000). The mitochondrial D-loop region was selected for this study because it is the most rapidly evolving region of the mitochondrial genome and has the highest substitution rate compared with other mitochondrial genes such as cytochrome *b* gene, 12S and 16S ribosomal RNA genes, or NADH subunits. Moreover, the D-loop region has an acceptable length and there are numerous sequences available in the databases (Fajardo et al., 2007b). The mitochondrial primers D-loopFW and D-loopREV used in the PCR technique developed in this work successfully amplified a conserved region of approximately 310 bp from the mitochondrial D-loop region of all quail, pheasant, red-legged partridge, chukar partridge, guinea fowl, capercaillie, Eurasian woodcock, woodpigeon, chicken, turkey, muscovy duck, and goose analyzed (Figure 2).

After amplification, the use of PCR-RFLP analysis to identify the origin of an unknown sample may be possible thanks to the use of the appropriate restriction endonucleases. Because previous sequence map data from authentic specimens are needed to provide species-spe-

**Table 2.** Predicted fragment sizes of the partial D-loop region based on sequence map analysis

Item	Quail	Pheasant	Red-legged partridge	Chukar partridge	Guinea fowl	Capercaillie	Eurasian woodcock	Woodpigeon	Chicken	Turkey	Muscovy duck	Goose
<i>Hinf</i> I	192 122	281 30	283 30	283 30	191 92 30	282 30	274 30	306	283 30	312	314	281 30
<i>Mbo</i> II	164 85 29 17 16 3	163 105 36 7	163 85 36 29	163 85 36 22 7	164 83 37 22 7	163 113 36	157 128 19	257 49	163 76 37 30 7	163 84 36 29	208 65 41	311
<i>Hpy</i> 188III	251 44 19	226 44 23 18	176 74 44 19	250 44 19	251 44 18	250 22 22 18	304	233 73	227 44 23 19	251 22 22 18	291 23	288 23



## IDENTIFICATION OF GAME BIRD MEAT

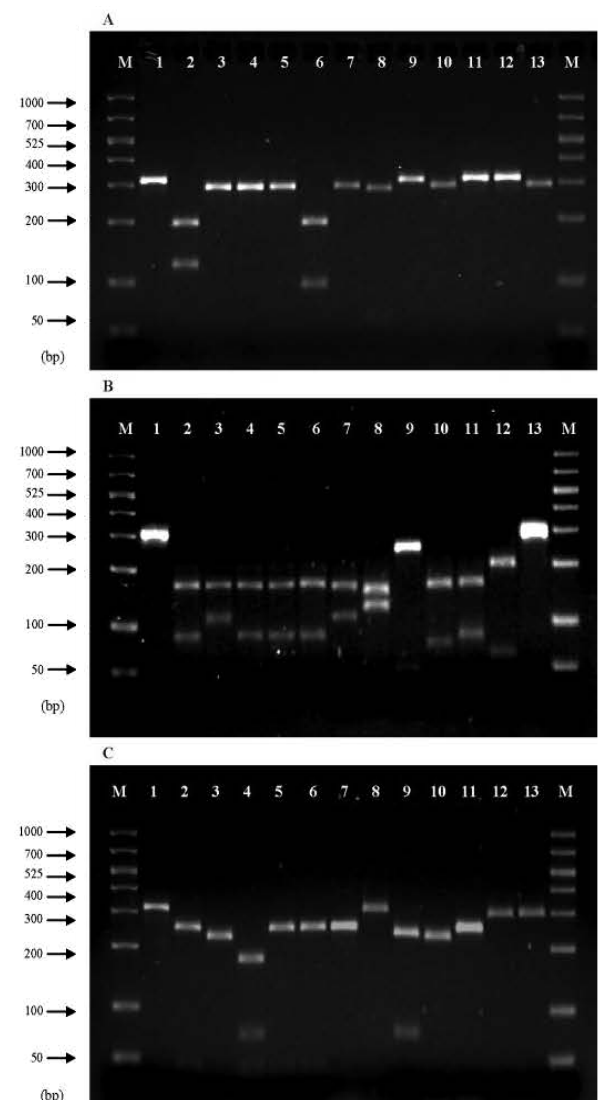
677

cific reference restriction patterns (Meyer et al., 1995), D-loop PCR products from at least 2 individuals of each selected meat species were purified from the gel and sequenced. Restriction map analysis of the D-loop region sequences obtained from quail (FM164774), pheasant (FM164775), red-legged partridge (FM164776), chukar partridge (FM164777), guinea fowl (FM164778), capercaillie (FM164779), Eurasian woodcock (FM164780), woodpigeon (FM164781), chicken (FM164782), turkey (FM164783), muscovy duck (FM164784), and goose (FM164785) allowed the selection of *Hinf*I, *Mbo*II, and *Hpy*188III endonucleases, as potential tools for the suitable identification of meats from the game bird species analyzed in this work (Figure 3). The cleavage patterns predicted from sequence map analysis are indicated in Table 2.

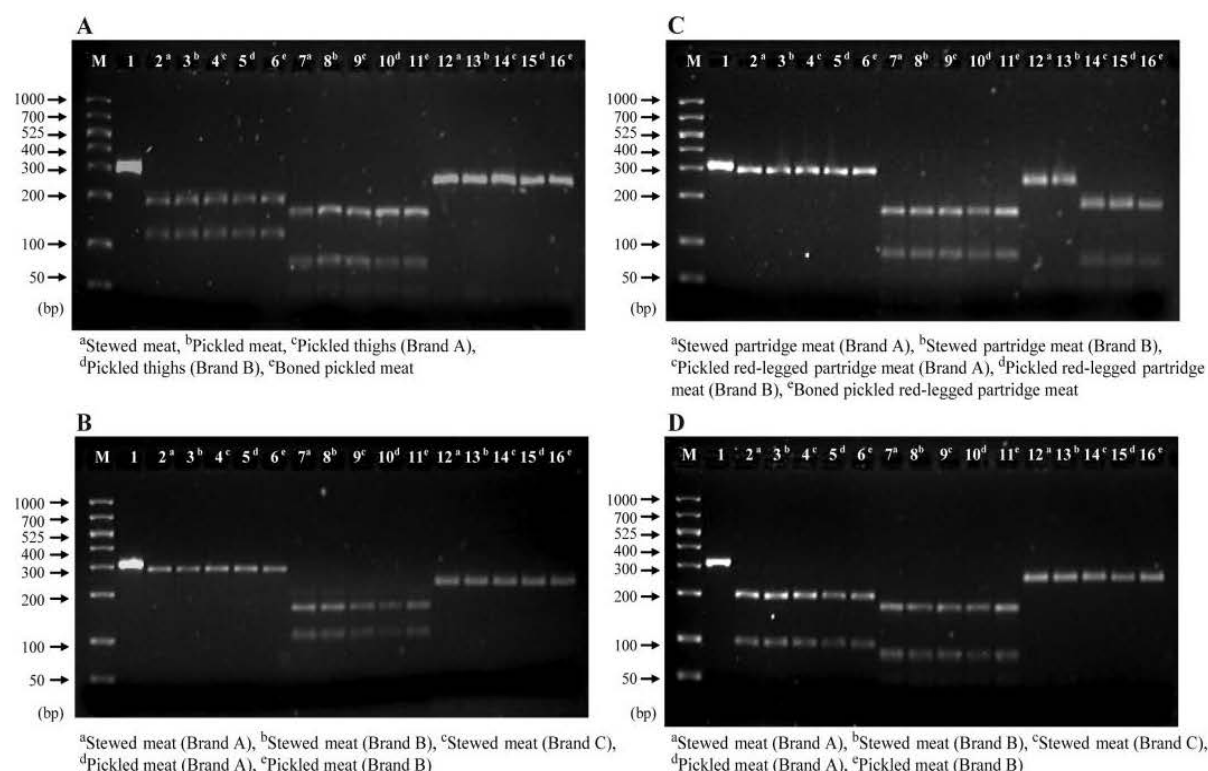
Results obtained after restriction analysis of mitochondrial D-loop region from quail, pheasant, red-legged partridge, chukar partridge, guinea fowl, capercaillie, Eurasian woodcock, woodpigeon, chicken, turkey, muscovy duck, and goose after incubation with *Hinf*I, *Mbo*II, and *Hpy*188III endonucleases are shown in Figures 4A, 4B, and 4C, respectively. As can be deduced from the figures, the combined use of the 3 mentioned enzymes allowed the specific identification of the 12 species analyzed. The *Hinf*I endonuclease cleaved the D-loop region products of quail and guinea fowl into visible DNA fragments of 192 and 122 bp and of 191 and 92 bp, respectively, allowing the differentiation between these 2 species from the rest of birds. However, a similar restriction pattern was generated in pheasant, red-legged partridge, chukar partridge, chicken, goose, capercaillie, and Eurasian woodcock. Similarly, the absence of restriction sites for *Hinf*I endonuclease in turkey, muscovy duck, and woodpigeon species caused an undigested PCR product of approximately the same length in these 3 species (Figure 4A). Nevertheless, visible restriction fragments generated with *Mbo*II endonuclease in turkey (163 and 84 bp), muscovy duck (208 and 65 bp), and woodpigeon (257 bp) allowed their differentiation. Besides, chicken (163 and 76 bp), goose (undigested PCR product), and Eurasian woodcock (157 and 128 bp) could also be differentiated with this enzyme. However, *Mbo*II endonuclease yielded a similar PCR-RFLP pattern in red-legged partridge and chukar partridge. The same problem appeared in pheasant and capercaillie (Figure 4B). Finally, digestions performed with *Hpy*188III endonuclease resulted in 2 visible DNA fragments of 176 and 74 bp in red-legged partridge, whereas 2 restriction sites present in chukar partridge sequence generated 1 visible DNA fragment of 250 bp. For pheasant and capercaillie samples, digestions performed with this enzyme resulted in 1 visible fragment of 226 bp in pheasant and 250 bp in capercaillie (Figure 4C).

It should be noted that several small DNA fragments resulting from D-loop region digestions could not be detected after electrophoresis of the samples. However, the *Hinf*I, *Mbo*II, and *Hpy*188III cleavage bands visual-

ized in the gel were enough and suitable for the discrimination of the 12 species analyzed. Besides, it is worth mentioning that the visible band sizes obtained by agarose gel electrophoresis after cleavage of PCR products with the 3 selected endonucleases were in agreement with the expected sizes for the restriction fragments above 50 bp inferred from sequence analysis. Conserved restriction sites found for *Hinf*I, *Mbo*II, and *Hpy*188III endonucleases among all quail, pheasant, red-legged partridge, chukar partridge, guinea fowl capercaillie, Eurasian woodcock, woodpigeon, chicken, turkey, muscovy duck, and goose D-loop region sequences facilitated



**Figure 4.** Electrophoretic analysis (3.5% MS8 agarose) of the restriction fragments obtained from D-loop region PCR products digested with (A) *Hinf*I, (B) *Mbo*II, and (C) *Hpy*188III endonucleases. Samples are: (1) undigested PCR product, (2) quail, (3) pheasant, (4) red-legged partridge, (5) chukar partridge, (6) guinea fowl, (7) capercaillie, (8) Eurasian woodcock, (9) woodpigeon, (10) chicken, (11) turkey, (12) muscovy duck, and (13) goose. M = molecular weight marker 50 to 1,000-bp ladder (Biomarker Low, BioVentures Inc., Murfreesboro, TN).



**Figure 5.** Electrophoretic analysis (3.5% MS8 agarose) of the restriction fragments obtained from the D-loop region PCR products of several commercial products from (A) quail, (B) pheasant, (C) partridge, and (D) guinea fowl. Samples correspond to restriction fragments generated with *HinfI* (lines 2 to 6), *MboII* (lines 7 to 11), and *HpyI88III* (lines 12 to 16) endonucleases. In all images, line 1 corresponds to an undigested PCR product. M = molecular weight marker 50 to 1,000-bp ladder (Biomarker Low, BioVentures Inc., Murfreesboro, TN).

consistent and unequivocal species-specific identification. Fifteen specimens from each species were analyzed and results did not show intraspecific polymorphism, suggesting reproducibility of the PCR-RFLP patterns with the 3 selected endonucleases.

To check the influence of processing treatments on the suitability of the PCR-RFLP method developed in this work, DNA extracted from experimentally sterilized (121°C for 20 min) meats from each species were also assayed. Amplification of the approximately 310-bp DNA fragment was successfully achieved with the conserved primers D-loopFW and D-loopREV and a subsequent restriction of the amplicons with the selected endonucleases was, thus, possible. Moreover, satisfactory results were also accomplished when several commercial processed meat products from quail, pheasant, partridge, and guinea fowl were analyzed. Results obtained after PCR-RFLP analysis indicated that the species origin of the commercial meat products was in accordance with their label statements (Table 1, Figure 5). It should be noted that in the case of partridge commercial products labeled as red-legged partridge meat the species detected was red-legged partridge, whereas in those labeled as partridge meat, the species detected was chukar partridge (Figure 5C). These results demonstrate that the PCR-RFLP technique described herein

is a useful method for game bird meat authentication, even for samples subjected to severe heat treatment, for which other methods cannot be applied.

In conclusion, the PCR-RFLP technique developed in this work provides a quick and simple tool that could be potentially used as routine control assay for authentication of game bird species in both raw and processed meats. Interpretation of the restriction profiles can be performed visually, avoiding the need for tedious sequencing analysis methods. Consequently, the PCR-RFLP technique described herein can be useful for the identification of mislabeled game bird species and also for avian meat industries as a tool to warrant the quality and identity of the game bird meats offered for sale.

## ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by grant no. AGL 2007-60077 from the Ministerio de Educación y Ciencia of Spain and the Programa de Vigilancia Sanitaria S-0505/AGR/000265 from the Comunidad de Madrid (Spain). María Rojas is recipient of a fellowship from the Ministerio de Educación y Ciencia (Spain). We are indebted to Santiago Lavin González (Facultad de Veterinaria, Universidad Autónoma de Barcelona, Spain)

## IDENTIFICATION OF GAME BIRD MEAT

679

and Juan José Negro Balmaseda (Estación Biológica de Doñana, Sevilla, Spain) for kindly supplying capercaillie and red-legged partridge samples.

## REFERENCES

- Arana, A., B. Soret, I. Lasa, and L. Alfonso. 2002. Met traceability using DNA markers: Application to the beef industry. *Meat Sci.* 61:367–373.
- Calvo, J. H., P. Zaragoza, and R. Osta. 2001. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) fingerprints for identification of species in poultry paté. *Poult. Sci.* 80:522–524.
- Colgan, S., L. O'Brien, M. Maher, N. Shilton, K. McDonnell, and S. Ward. 2001. Development of a DNA-based assay for species identification in meat and bone meal. *Food Res. Int.* 34:409–414.
- Colombo, F., E. Marchisio, A. Pizzini, and C. Cantoni. 2002. Identification of the goose species (*Anser anser*) in Italian "mortara" salami by DNA sequencing and a polymerase chain reaction with an original primer pair. *Meat Sci.* 61:291–294.
- Dalmasso, A., E. Fontanella, P. Piatti, T. Civera, S. Rosati, and M. T. Bottero. 2004. A multiplex PCR assay for the identification of animal species in feedstuffs. *Mol. Cell. Probes* 18:81–87.
- Dalvit, C., M. De Marchi, and M. Cassandro. 2007. Genetic traceability of livestock products: A review. *Meat Sci.* 77:437–449.
- Dooley, J. J., H. D. Sage, H. M. Brown, and S. D. Garret. 2005. Improved fish species identification by use of lab-on-a-chip technology. *Food Contr.* 16:601–607.
- European Commission. 1979. Council Directive 79/409/EEC of 2 April 1979 on the conservation of wild birds. *Off. J. Eur. Comm.* L 103:1–18.
- Fajardo, V., I. González, I. López-Calleja, I. Martín, P. E. Hernández, T. García, and R. Martín. 2006. PCR-RFLP authentication of meats from red deer (*Cervus elaphus*), fallow deer (*Dama dama*), roe deer (*Capreolus capreolus*), cattle (*Bos taurus*), sheep (*Ovis aries*), and goat (*Capra hircus*). *J. Agric. Food Chem.* 54:1144–1150.
- Fajardo, V., I. González, I. López-Calleja, I. Martín, M. Rojas, P. E. Hernández, T. García, and R. Martín. 2007a. PCR identification of meats from chamois (*Rupicapra rupicapra*), pyrenean ibex (*Capra pyrenaica*), and mouflon (*Ovis ammon*) targeting specific sequences from the mitochondrial D-loop region. *Meat Sci.* 76:644–652.
- Fajardo, V., I. González, I. Martín, M. Rojas, P. E. Hernández, T. García, and R. Martín. 2007b. Differentiation of European wild boar (*Sus scrofa scrofa*) and domestic swine (*Sus scrofa domestica*) meats by PCR analysis targeting the mitochondrial D-loop and the nuclear melanocortin receptor 1 (MC1R) genes. *Meat Sci.* 78:314–322.
- Fajardo, V., I. González, I. Martín, M. Rojas, P. E. Hernández, T. García, and R. Martín. 2007c. Analysis of mitochondrial DNA for authentication of meats from chamois (*Rupicapra rupicapra*), pyrenean ibex (*Capra pyrenaica*), and mouflon (*Ovis ammon*) by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism. *J. AOAC Int.* 90:179–186.
- García, C. B., and M. V. Arruga. 2006. Comparative genetic analysis between red-legged partridges (*Alectoris rufa*) and chukar partridges (*Alectoris chukar*): Identification of single-nucleotide polymorphisms. *Anim. Res.* 55:335–342.
- Girish, P. S., A. S. R. Anjaneyulu, K. N. Viswas, M. Anand, N. Rajkumar, B. M. Shivakumar, and B. Sharma. 2004. Sequence analysis of mitochondrial 12S rRNA gene can identify meat species. *Meat Sci.* 66:551–556.
- Girish, P. S., A. S. R. Anjaneyulu, K. N. Viswas, F. H. Santhosh, K. N. Bhilegaonkar, R. K. Agarwal, N. Kondaiah, and K. Nagappa. 2007. Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism of mitochondrial 12S rRNA gene: A simple method for identification of poultry meat species. *Vet. Res. Commun.* 31:447–455.
- Girish, P. S., A. S. R. Anjaneyulu, K. N. Viswas, B. M. Shivakumar, M. Anand, M. Patel, and B. Sharma. 2005. Meat species identification by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) of mitochondrial 12S rRNA gene. *Meat Sci.* 70:107–112.
- Hird, H., R. Goodier, and M. Hill. 2003. Rapid detection of chicken and turkey in heated meat products using the polymerase chain reaction followed by amplicons visualization with vista green. *Meat Sci.* 65:1117–1123.
- La Neve, F., T. Civera, N. Mucci, and M. T. Bottero. 2008. Authentication of meat from game and domestic species by SNaPshot minisequencing analysis. *Meat Sci.* 80:216–224.
- Liu, L. H., F. C. Chen, J. L. Dorsey, and Y. H. P. Hsieh. 2006. Sensitive monoclonal antibody-based sandwich ELISA for the detection of porcine skeletal muscle in meat and feed products. *J. Food Sci.* 71:M1–M6.
- Mafra, I., I. M. P. L. V. O. Ferreira, and M. B. P. P. Oliveira. 2007. Food authentication by PCR-based methods. *Eur. Food Res. Technol.* 227:649–665.
- Martín, I., T. García, V. Fajardo, I. López-Calleja, M. Rojas, P. E. Hernández, I. González, and R. Martín. 2007. Mitochondrial markers for the detection of four duck species and the specific identification of muscovy duck in meat mixtures using the polymerase chain reaction. *Meat Sci.* 76:721–729.
- Meyer, R., C. Höfelein, J. Lüthy, and U. Candrian. 1995. Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis: A simple method for species identification in food. *J. AOAC Int.* 78:1542–1551.
- Murray, B. W., R. A. McClymont, and C. Stroheck. 1995. Forensic identification of ungulate species using restriction digests of PCR-amplified mitochondrial DNA. *J. Forensic Sci.* 40:943–951.
- Pascoal, A., M. Prado, P. Calo, A. Cepeda, and J. Barros-Velázquez. 2005. Detection of bovine DNA in raw and heat-processed foodstuffs, commercial foods and specific risk materials by a novel specific polymerase chain reaction method. *Eur. Food Res. Technol.* 220:444–450.
- Peter, C., C. Brünen-Nieweler, K. Cammann, and T. Borchers. 2004. Differentiation of animal species in food by oligonucleotide microarray hybridization. *Eur. Food Res. Technol.* 219:286–293.
- Rencova, E., I. Svoboda, and I. Necidova. 2000. Identification by ELISA of poultry, horse, kangaroo, and rat muscle specific proteins in heat processed products. *Vet. Med.* 45:353–356.
- Saez, R., Y. Sanz, and F. Toldrá. 2004. PCR-based fingerprinting techniques for rapid detection of animal species in meat products. *Meat Sci.* 66:659–665.
- Saini, M., D. K. Das, A. Dhara, D. Swarup, M. P. Yadav, and P. K. Gupta. 2007. Characterisation of peacock (*Pavo cristatus*) mitochondrial 12S rRNA sequence and its use in differentiation from closely related poultry species. *Br. Poult. Sci.* 48:162–166.
- Santaclara, F. J., M. Espiñeira, A. G. Cabado, and J. M. Veites. 2007. Detection of land animal remains in fish meals by the polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism technique. *J. Agric. Food Chem.* 55:305–310.
- Tejedor, M. T., L. V. Monteagudo, S. Mautner, E. Hadjisterkotis, and M. V. Arruga. 2007. Introgression of *Alectoris chukar* genes into a Spanish wild *Alectoris rufa* population. *J. Hered.* 98:179–182.
- Teletchea, F., C. Maudet, and C. Hänni. 2005. Food and forensic molecular identification: update and challenges. *Trends Biotechnol.* 23:359–366.
- Toorop, R. M., S. J. Murch, and R. O. Ball. 1997. Methodology and development of prediction equations for the determination of pork substitution in veal. *Food Res. Int.* 30:629–636.
- Vallejo-Cordoba, B., A. F. González, M. A. Mazon, and R. Rodríguez. 2005. Capillary electrophoresis for the analysis of meat authenticity. *J. Sep. Sci.* 28:826–836.
- Verkaar, E. L. C., I. J. Nijman, K. Boutaga, and J. A. Lenstra. 2002. Differentiation of cattle species in beef by PCR-RFLP of mitochondrial and satellite DNA. *Meat Sci.* 60:365–369.
- Wolf, C., M. Burgener, P. Hübner, and J. Lüthy. 2000. PCR-RFLP analysis of mitochondrial DNA: Differentiation of fish species. *Lebensn. Wiss. Technol.* 33:144–150.
- Zhang, J., H. Huang, Z. Cai, and L. Huang. 2007. Species identification in salted products of red snappers by semi-nested PCR-RFLP based on the mitochondrial 12S rRNA gene sequence. *Food Contr.* 18:1331–1336.





### III.1. IDENTIFICATION OF MEAT AND MEAT PRODUCTS FROM GAME AND ALTERNATIVE POULTRY FARMING AVIAN SPECIES BY GENETIC TECHNIQUES

#### III.1.2. PCR USING SPECIES-SPECIFIC PRIMERS

- Authentication of meats from quail (*Coturnix coturnix*), pheasant (*Phasianus colchicus*), partridge (*Alectoris* spp.), and guinea fowl (*Numida meleagris*) using polymerase chain reaction targeting specific sequences from the mitochondrial 12S rRNA gene.



#### ***Food Control***

Volume 20, pages 896-902, 2009

- Polymerase chain reaction assay for verifying the labelling of meat and commercial meat products from game birds targeting specific sequences from the mitochondrial D-loop region.



#### ***Poultry Science***

Volume 89, pages 1021-1032, 2010

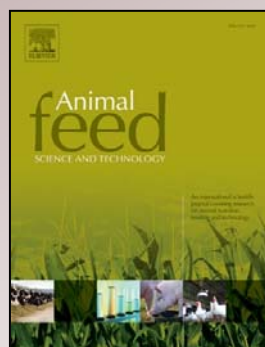


- Mitochondrial and nuclear markers for the authentication of partridge meat and the specific identification of red-legged partridge meat products by polymerase chain reaction.



***Poultry Science***  
Volume 90, pages 211-222, 2011

- Application of species-specific polymerase chain reaction assays to verify the labeling of quail (*Coturnix coturnix*), pheasant (*Phasianus colchicus*) and ostrich (*Struthio camelus*) in pet foods.



***Animal Feed Science and Technology***  
Volume 169, pages 128-133, 2011





Contents lists available at ScienceDirect

## Food Control

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/foodcont](http://www.elsevier.com/locate/foodcont)

# Authentication of meats from quail (*Coturnix coturnix*), pheasant (*Phasianus colchicus*), partridge (*Alectoris* spp.), and guinea fowl (*Numida meleagris*) using polymerase chain reaction targeting specific sequences from the mitochondrial 12S rRNA gene

María Rojas, Isabel González, Violeta Fajardo, Irene Martín, Pablo E. Hernández, Teresa García, Rosario Martín \*

Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense, 28040 Madrid, Spain

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 18 April 2008

Received in revised form 17 December 2008

Accepted 28 December 2008

## Keywords:

Game birds

12S rRNA gene

Species-specific PCR

## ABSTRACT

Polymerase chain reaction (PCR) based on oligonucleotide primers targeting the mitochondrial 12S rRNA gene has been applied to the specific identification of meats from quail (*Coturnix coturnix*), pheasant (*Phasianus colchicus*), partridge (*Alectoris* spp.), and guinea fowl (*Numida meleagris*). The use of specific primers pairs for quail, pheasant, partridge and guinea fowl allowed the selective amplification of the desired avian sequences. The specificity of each primer pair was verified by PCR analysis of DNA from meats of various game and domestic bird and mammalian species. The assay can be useful for the accurate identification of meats from game bird species, avoiding mislabelling or fraudulent species substitution in meat products.

© 2009 Elsevier Ltd. All rights reserved.

## 1. Introduction

Recent food scares (e.g. BSE, avian flu, etc.) and malpractices of some food producers have tremendously reinforced public awareness regarding the origin of an animal product. However, because labels do not provide sufficient guarantee, it is necessary to identify and/or authenticate the origin of an animal product, thus protecting both consumers and producers from illegal substitutions. In this sense, game bird meat is a susceptible target for fraudulent labelling due to the tremendous profit that results from selling less costly avian meat as meat from much more demanded and higher priced species.

The European Union has applied, since 2005, strict legislation on labelling systems to guarantee meat traceability. It has been demonstrated that traceability methods based only on batch codes or paper documents can not always be trusted, being easy to be counterfeit. At present, protein and DNA based techniques seem to be appropriate tools for the verification of the origin of animal products in order to guarantee its traceability. Protein based methods include immunoassays, that are the most widely used, with several companies supplying kits for a range of species. However, because proteins are denatured during heat and pressure processing, only antibodies raised against heat-stable biomarkers can be

used for detection of species in a processed sample. By contrast, DNA has the advantage of being a relatively stable molecule, is more able to withstand heat and pressure processing and also its structure is conserved within all tissues of an individual. For this reason, immunological analyses have been replaced by DNA-based methods (Martín et al., 2007; Rodríguez et al., 2003). In particular, the introduction of polymerase chain reaction (PCR) methodology in food analysis has provided a vast range of techniques for rapid detection and identification of organisms in a wide array of degraded and processed substrates (Fajardo et al., 2007c).

PCR-based techniques most frequently used for meat species identification include the development of conserved mitochondrial or nuclear DNA primers for PCR amplification, followed by complementary techniques such as sequencing or PCR-RFLP (Bellagamba, Moretti, Comincini, & Valfrè, 2001; Fajardo et al., 2006, 2007a; Girish et al., 2004; Prado, Calo-Mata, Villa, Cepeda, & Barros-Velázquez, 2007; Wolf, Rentsch, & Hübner, 1999). Alternatively, PCR using species-specific primers can be also used for species identification without the need of further sequencing or digestion of the PCR products with restriction enzymes (Kesmen, Sahin, & Yetim, 2007; Martín et al., 2007).

The consumption of game bird meat has gained increasing favour among consumers, who appreciate its texture and flavour as well as the low fat and cholesterol content (La Neve, Civera, Mucci, & Bottero, 2008). In recent years, typical game bird species such as quail (*Coturnix coturnix*), pheasant (*Phasianus colchicus*), and

\* Corresponding author. Tel.: +34 913943752; fax: +34 913943743.  
E-mail address: [rmartins@vet.ucm.es](mailto:rmartins@vet.ucm.es) (R. Martín).



partridge (*Alectoris* spp.) are being produced in alternative poultry farms together with other avian species such as guinea fowl (*Numida meleagris*). This has resulted in a greater availability of this kind of meat and a proliferation of marinade, boned, minced, and filleted avian products. In this paper, we describe a method for the specific identification of meats from quail, pheasant, partridge, and guinea fowl, based on selective PCR amplification of DNA fragments on the mitochondrial 12S rRNA gene.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Selection and preparation of meat samples

Authentic muscle samples of quail (*Coturnix coturnix*), pheasant (*Phasianus colchicus*), red-legged partridge (*Alectoris rufa*), guinea fowl (*Numida meleagris*), eurasian woodcock (*Scolopax rusticola*), woodpigeon (*Columba palumbus*), and song thrush (*Turdus philomelos*), were provided by Antonio de Miguel (Madrid, Spain). Red-legged partridge samples were also obtained from the Estación Biológica de Doñana (Sevilla, Spain). Chukar partridge (*Alectoris chukar*) meat samples were provided by Hermanos Sainz (Madrid, Spain). Barbary partridge (*Alectoris barbara*) meat samples were obtained from the Department of Animal Production (Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid). Capercaillie (*Tetrao urogallus*) meat samples were obtained from the Department of Animal Pathology (Facultad de Veterinaria, Universidad Autónoma de Barcelona, Spain). Chicken (*Gallus gallus*), turkey (*Meleagris gallopavo*), muscovy duck (*Cairina moschata*), and goose (*Anser anser*) meat samples were purchased from several retail markets (Madrid, Spain). Muscle samples from cattle (*Bos taurus*), sheep (*Ovis aries*), goat (*Capra hircus*), swine (*Sus scrofa domestica*), red-deer (*Cervus elaphus*), fallow-deer (*Dama dama*), roe-deer (*Capreolus capreolus*), chamois (*Rupicapra rupicapra*), mouflon (*Ovis ammon*), and pyrenean ibex (*Capra pyrenaica*) were obtained from several Spanish abattoirs and meat-cutting installations. All specimens were morphologically identified before obtaining the samples.

Fresh muscle portions from the selected specimens were processed immediately or stored frozen at  $-20^{\circ}\text{C}$  until use. Quail, pheasant, partridge, and guinea fowl meats were also analyzed after being subjected to experimental pasteurization ( $72^{\circ}\text{C}$  for 30 min) and sterilization ( $121^{\circ}\text{C}$  for 20 min) treatments.

Binary mixtures of quail, pheasant, partridge, or guinea fowl with chicken meat were prepared using raw muscles from the selected species. For each meat mixture, five different percentages containing 0.1%, 1%, 5%, 10%, and 25% (wt/wt) of the target species were prepared with a blender (Sunbeam Oster, FL) to a final weight of 100 g. The 100% from quail, pheasant, partridge, guinea fowl, and

chicken meats was also used as control in the analysis of the binary mixtures. Fifty grams of each mixture was sterilized at  $121^{\circ}\text{C}$  for 20 min.

Several commercial processed meat products from quail, pheasant, partridge, and guinea fowl species purchased from different retail markets were also included in the analysis.

### 2.2. DNA extraction

Total DNA was extracted from meat using a Wizard® DNA Clean-up System kit (Promega Corp., Madison, WI) following the procedure described by Fajardo et al. (2006).

The DNA extracted from raw and processed tissues was electrophoresed in a 1% D1 (Hispanlab S.A., Torrejón, Spain) agarose gel containing 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ethidium bromide in Tris-acetate buffer (0.04 M Tris-acetate and 0.001 M EDTA, pH 8.0) for 30 min at 110 V. Total DNA was visualized by UV transillumination using a Geldoc 1000 UV Fluorescent Gel Documentation System-PC (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA).

### 2.3. Amplification and sequencing of a conserved fragment in the 12S rRNA gene from different game bird and domestic meats

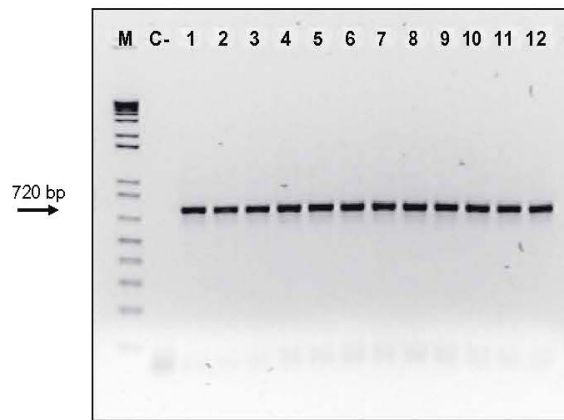
12S-FW and 12S-REV oligonucleotides (Table 1) designed by Fajardo et al. (2006) were used for the amplification of an approximately 720 bp conserved fragment of the 12S rRNA gene from quail, pheasant, red-legged partridge, chukar partridge, barbary partridge, guinea fowl, capercaillie, eurasian woodcock, woodpigeon, song thrush, chicken, turkey, muscovy duck, and goose.

PCR amplification reactions were performed in a total volume of 25  $\mu\text{L}$ . Each reaction mixture contained 100 ng of template DNA, 2 mM  $\text{MgCl}_2$ , 200  $\mu\text{M}$  of each dNTP, 5 pmol of each primer, and 1 unit of Tth DNA polymerase (Biotools, Madrid, Spain) in a reaction buffer containing 75 mM Tris-HCl, pH 9.0; 50 mM KCl, 20 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , and 0.001% BSA.

PCR amplification was carried out in a Progene thermal cycler (Techne Ltd., Cambridge, UK). Forty cycles of amplification with the following step cycle profile were programmed: strand denaturation at  $93^{\circ}\text{C}$  for 30 s, primer annealing at  $65^{\circ}\text{C}$  for 30 s, and primer extension at  $72^{\circ}\text{C}$  for 45 s. An initial denaturation at  $93^{\circ}\text{C}$  for 2 min, and a final extension at  $72^{\circ}\text{C}$  for 5 min improved the product yield. PCR products (10  $\mu\text{L}$ ) were mixed with 2  $\mu\text{L}$  of gel loading solution (Sigma), and loaded in a 2% D1 (Hispanlab S.A., Torrejón, Spain) agarose gel containing 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ethidium bromide in Tris-acetate buffer (0.04 M Tris-acetate and 0.001 M EDTA, pH 8.0). Electrophoretic separation was performed at 100 V for 30 min. The resulting DNA fragments were visualized by UV transillumination and analyzed using a Geldoc 1000 UV Fluorescent Gel Documentation System-PC (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA).

**Table 1**  
DNA sequences of the primers used in this study.

Primers	Length (bp)	Sequence (5'-3')	Description
12S-FW	20	GGTAAATCTCGTGCCAGCCA	Conserved forward primer
12S-REV	25	TCCAGTATGCTTACCTTGTACGAC	Conserved reverse primer
18SEU-FW	28	GCTCATTAATCAGTTATGGTTCCTTTG	Endogenous control forward
18SEU-REV	26	CGTCGGCATGTATTAGCTCTAGAATT	Endogenous control reverse
12SCOT-FW	27	GATTIAGCAGTAAATGGGATCACTTT	Quail forward primer
12SCOT-REV	22	TCGTCITTTGGCTTAATGGTTGG	Quail reverse primer
12SPHA-FW	23	AGTGGTCATATGTTATCCTCACC	Pheasant forward primer
12SPHA-REV	21	GGGGTAAATAGTCGTGGAG	Pheasant reverse primer
12SALEC-FW	26	CGACCTAAAACATCTTAGTTCCTCA	Partridge forward primer
12SALEC-REV	24	CGTAGTCTCTGGGCGGATATATTG	Partridge reverse primer
12SNUM-FW	24	ACCTCAAACAATCTTAGCCACCA	Guinea fowl forward primer
12SNUM-REV	25	TTCTCAGGCGGATACCTAGGTATTG	Guinea fowl reverse primer



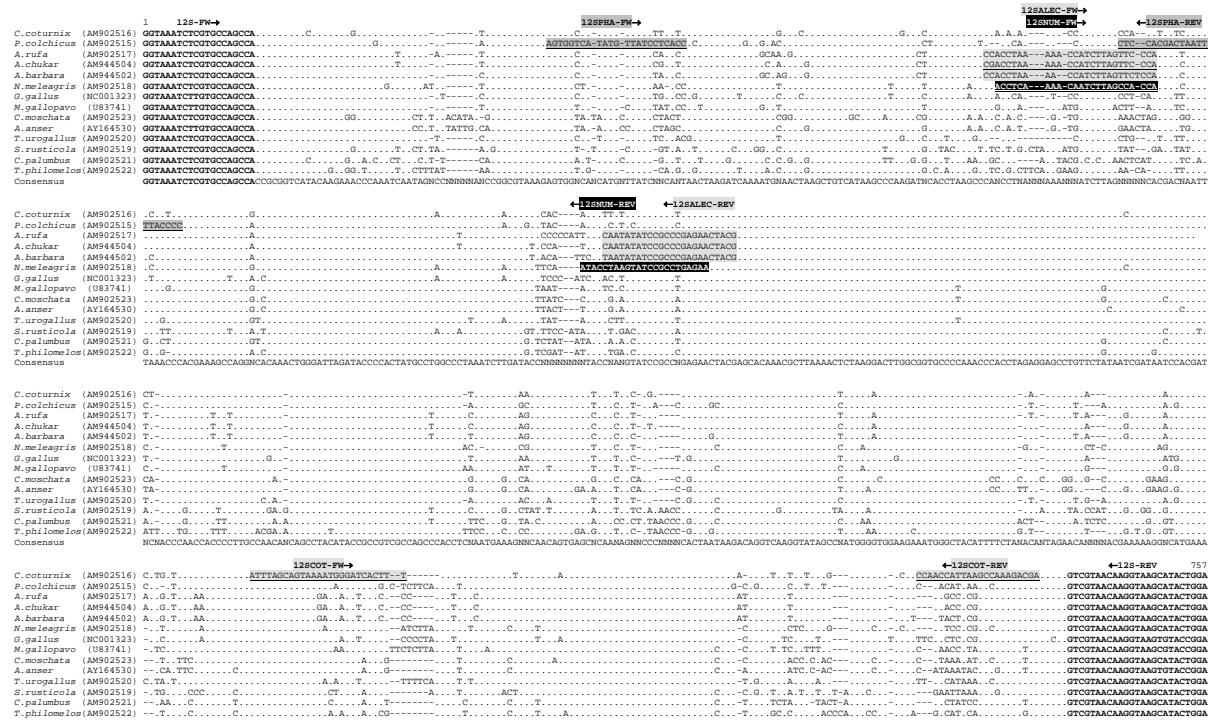
**Fig. 1.** Electrophoretic analysis of the conserved 12S rRNA gene PCR products obtained from (1) quail, (2) pheasant, (3) red-legged partridge, (4) chukar partridge, (5) barbery partridge, (6) guinea fowl, (7) capercaillie, (8) eurasian woodcock, (9) woodpigeon, (10) song thrush, (11) chicken, and (12) turkey using 12S-FW and 12S-REV primers. M, molecular weight marker 1kb plus DNA ladder (GibcoBRL). C-, negative control.

Mitochondrial 12S rRNA gene amplicons were subsequently purified and sequenced following the procedure described by Fajardo et al. (2006). 12S-FW and 12S-REV oligonucleotides were used in the sequencing reactions. Sequencing of PCR products from chicken, turkey, and goose was not necessary due to the high number of 12S rRNA sequences of these species available in the Genbank/EMBL database.

#### 2.4. Design of avian-specific primers and PCR amplification of the selected DNA fragments from quail, pheasant, partridge, and guinea fowl meats

Alignment of 12S rRNA gene sequences obtained from quail (AM902516), pheasant (AM902515), red-legged partridge (AM902517), chukar partridge (AM944504), barbery partridge (AM944502), guinea fowl (AM902518), capercaillie (AM902520), eurasian woodcock (AM902519), woodpigeon (AM902521), song thrush (AM902522), chicken (NC001323), turkey (U83741), muscovy duck (AM902523), and goose (AY164530) was performed using the EMBOSS software package, version 2.2.0. Based upon detailed analysis and comparison of the aligned 12S rRNA sequences, four species-specific primer pairs were designed: 12SCOT-FW/12SCOT-REV, 12SPHA-FW/12SPHA-REV, 12SALEC-FW/12SALEC-REV, and 12SNUM-FW/12SNUM-REV. They were expected to yield specific fragments of 129 bp, 113 bp, 141 bp, and 130 bp in the 12S rRNA gene of quail, pheasant, partridge, and guinea fowl, respectively. Besides, another primer pair based on conserved mt 18S rRNA gene sequences available in the Genbank/EMBL database for various avian and mammal species (18SEU-FW and 18SEU-REV) was used as positive control of the assay. These primers were expected to amplify a conserved region of 89 bp of the 18S rRNA gene in all the analyzed species. The sequence and description of the primers used in this work is summarized in Table 1.

DNA amplifications were carried out in a final volume of 25  $\mu$ L containing 10 ng of template DNA, 2 mM  $MgCl_2$ , 200  $\mu$ M of each dNTP, 10 pmol (quail and partridge primers) or 5 pmol (pheasant and guinea fowl primers), and 1 unit of Tth DNA polymerase (Bio-tools, Madrid, Spain) in a reaction buffer containing 75 mM Tris-



**Fig. 2.** DNA sequence alignment of the 12S rRNA gene PCR products from quail (*C. coturnix*; AM902516), pheasant (*P. colchicus*; AM902515), red-legged partridge (*A. rufa*; AM902517), chukar partridge (*A. chukar*; AM944504), barbery partridge (*A. barbara*; AM944502), guinea fowl (*N. meleagris*; AM902518), capercaillie (*T. urogallus*; AM902520), eurasian woodcock (*S. rusticola*; AM902519), woodpigeon (*C. palumbus*; AM902521), song thrush (*T. philomelos*; AM902522), chicken (*G. gallus*; NC001323), turkey (*M. gallopavo*; U83741), muscovy duck (*C. moschata*; AM902523), and goose (*A. anser*; AY164530). Boldfaced nucleotides indicate the position of primers 12S-FW and 12S-REV used for sequencing. Primers 12SCOT-FW/12SCOT-REV, 12SPHA-FW/12SPHA-REV, 12SALEC-FW/12SALEC-REV, and 12SNUM-FW/12SNUM-REV are underlined and shaded.



HCl, pH 9.0; 50 mM KCl, 20 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, and 0.001% bovine serum albumin (BSA). Forty amplification cycles were performed with the following step-cycle profile: strand denaturation at 93 °C for 30 s, primer annealing at 65 °C (for quail and guinea fowl), 60 °C (for pheasant) or 55 °C (for partridge) for 30 s, and primer extension at 72 °C for 45 s. The last extension step was 5 min longer. An initial denaturation at 93 °C for 2 min was carried out to improve the final result. At each PCR conditions, internal control amplifications were set with 18SEU-FW and 18SEU-REV primers.

PCR products (10 µL) amplified with species-specific primers were electrophoresed in a 2% D1 (Hispanlab S.A., Torrejón, Spain) agarose gel. PCR products (10 µL) amplified with endogenous control primers were electrophoresed in a 3.5% MS8 (Hispanlab S.A., Torrejón, Spain) agarose gel. Each agarose gel contained 1 µg/mL ethidium bromide in Tris–acetate buffer (0.04 M Tris–acetate and 0.001 M EDTA, pH 8.0). Electrophoretic separation was performed at 90 V for 60 min and the resulting DNA fragments were visualized by UV transillumination and analyzed using a Geldoc 1000 UV Fluorescent Gel Documentation System-PC (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA).

### 3. Results and discussion

DNA-based molecular techniques developed over the last two decades have raised the hopes of developing authentic and reliable methods for species identification, due to the stability of DNA at high temperatures and the fact that its structure is conserved within all tissues of an individual (Saini et al., 2007). Among genetic techniques, polymerase chain reaction (PCR), has proven highly useful in tracing the species origin in food (Colgan et al., 2001). This paper reports a PCR method for the specific identification of meats from quail (*Coturnix coturnix*), pheasant (*Phasianus colchicus*), partridge (*Alectoris* spp.), and guinea fowl (*Numida meleagris*) based on selective amplification of sequences from the mitochondrial 12S rRNA gene.

The mitochondrial encoded gene for 12S rRNA was selected in this work as the target sequence for species identification because

of the high copy number of small, circular mitochondrial DNA in cells (Partis et al., 2000). A higher copy number of mitochondrial DNA ensures a sufficiently high quantity of PCR product, even when small amounts of fresh or processed tissues are included (Girish et al., 2005). In addition, the evolution rate of mitochondrial DNA is much faster than that of nuclear DNA and thus contains more sequence variations thereby facilitating identification of closely related species (Zhang, Huang, Cai, & Huang, 2007). As shown in Fig. 1, the mitochondrial conserved primers 12S-FW and 12S-REV used in the PCR technique developed in this work, consistently amplified a 12S rRNA gene fragment of approximately 720 bp from meats of quail, pheasant, red-legged partridge, chukar partridge, barbery partridge, guinea fowl, capercaillie, eurasian woodcock, woodpigeon, song thrush, chicken, and turkey species.

Following PCR amplification with the 12S conserved primers, amplicons from at least two individuals from each quail, pheasant, partridge, and guinea fowl species were sequenced and aligned in order to search for a DNA segment with sufficient species-to-species variation to enable their discrimination. Moreover, to establish and assess a wider spectrum of PCR specificity, 12S rRNA gene sequences obtained from other game and domestic species such as capercaillie, eurasian woodcock, woodpigeon, song thrush, chicken, turkey, muscovy duck, and goose were also included in the alignment. The detailed study of the sequence multialignment allowed the design of specific primers pairs for quail (12SCOT-FW/12SCOT-REV), pheasant (12SPHA-FW/12SPHA-REV), partridge (12SALEC-FW/12SALEC-REV), and guinea fowl (12SNUM-FW/12SNUM-REV) (Fig. 2).

Results of PCR amplifications indicated that the size of the amplicons obtained with the four species-specific primer pairs were as expected from sequence analysis. Specific DNA fragments of 129, 113, 141, and 130 bp were successfully amplified with quail, pheasant, partridge, and guinea fowl primer sets, respectively, showing no amplification on DNA from the rest of the meat species analyzed (Table 2). Conserved partridge primers were designed to recognize red-legged partridge, chukar partridge, and barbery partridge which are the most important commercialized partridge species. Twenty specimens from every selected meat

**Table 2**

Specificity of the primer pairs designed for the specific detection of quail (12SCOT-FW/12SCOT-REV), pheasant (12SPHA-FW/12SPHA-REV), partridge (12SALEC-FW/12SALEC-REV), and guinea fowl (12SNUM-FW/12SNUM-REV) meats, using DNAs from several avian and mammal species. Primers 18SEU-FW/18SEU-REV were used as positive control of assay.

Common name	Scientific name	12SCOT-FW 12SCOT-REV (bp)	12SPHA-FW 12SPHA-REV (bp)	12SALEC-FW 12SALEC-REV (bp)	12SNUM-FW 12SNUM-REV (bp)	18SEU-FW 18SEU-REV (bp)
Quail	<i>Coturnix coturnix</i>	129	— <sup>a</sup>	—	—	89
Pheasant	<i>Phasianus colchicus</i>	—	113	—	—	89
Red-legged partridge	<i>Alectoris rufa</i>	—	—	141	—	89
Chukar partridge	<i>Alectoris chukar</i>	—	—	141	—	89
Barbery partridge	<i>Alectoris barbara</i>	—	—	141	—	89
Guinea fowl	<i>Numida meleagris</i>	—	—	—	130	89
Capercaillie	<i>Tetrao urogallus</i>	—	—	—	—	89
Eurasian woodcock	<i>Scolopax rusticola</i>	—	—	—	—	89
Woodpigeon	<i>Columba palumbus</i>	—	—	—	—	89
Song thrush	<i>Turdus philomelos</i>	—	—	—	—	89
Chicken	<i>Gallus gallus</i>	—	—	—	—	89
Turkey	<i>Meleagris gallopavo</i>	—	—	—	—	89
Muscovy duck	<i>Cairina moschata</i>	—	—	—	—	89
Goose	<i>Anser anser</i>	—	—	—	—	89
Cattle	<i>Bos taurus</i>	—	—	—	—	89
Sheep	<i>Ovis aries</i>	—	—	—	—	89
Goat	<i>Capra hircus</i>	—	—	—	—	89
Swine	<i>Sus scrofa dom.</i>	—	—	—	—	89
Fallow deer	<i>Dama dama</i>	—	—	—	—	89
Roe deer	<i>Capreolus capreolus</i>	—	—	—	—	89
Red deer	<i>Cervus elaphus</i>	—	—	—	—	89
Chamois	<i>Rupicapra rupicapra</i>	—	—	—	—	89
Mouflon	<i>Ovis ammon</i>	—	—	—	—	89
Pyrenean ibex	<i>Capra pyrenaica</i>	—	—	—	—	89

<sup>a</sup> Means no amplification of the PCR product.

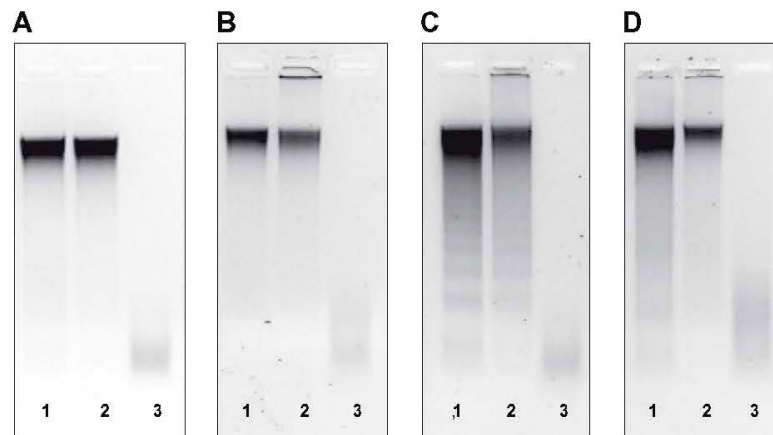
species were analyzed in the PCR assays, yielding consistent and reproducible DNA amplification bands. These results suggest an optimum specificity of the four primer pairs when tested for PCR amplification against a high number of game and domestic meat species distributed for human consumption.

A common problem of PCR-based methods is failure of DNA amplification due to the presence of inhibitory substances in the samples. Thus it is essential to include positive controls in order to avoid false-negative results. For this reason, an endogenous control amplification was performed in each PCR experiment using 18SEU-FW and 18SEU-REV primers (Table 2). These primers successfully amplified a conserved 89 bp fragment on the 18S rRNA gene of all game and domestic species analyzed.

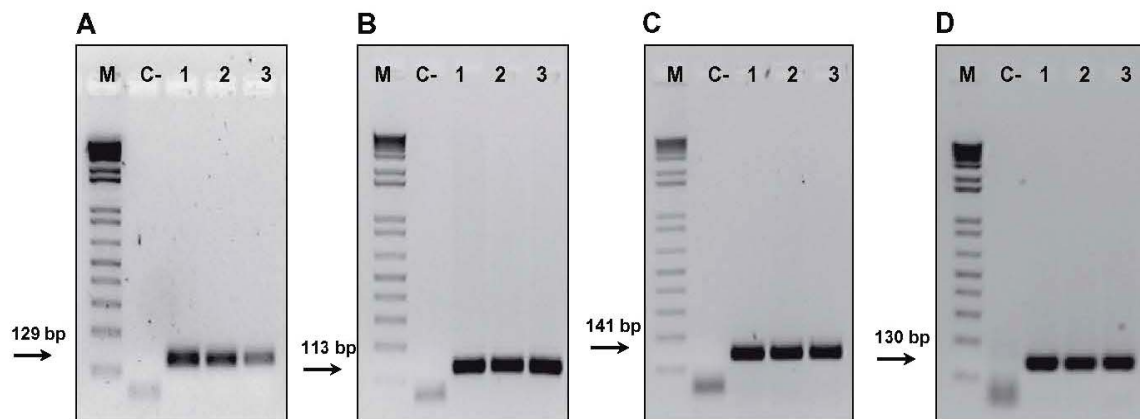
It is known that a critical factor in PCR analysis is related with the identification of the animal origin of processed meat products. The high temperature and pressure treatments used in some meat products may cause fragmentation of DNA, leading to difficulties to obtain reliable results in PCR amplification (Colgan et al., 2001). Because of this, species identification in samples where DNA can be severely degraded must rely on amplification of short DNA targets (Krcmar & Rencova, 2005).

To determine the influence of processing treatments on the suitability of the PCR method developed, DNA extracted from experimentally pasteurized (72 °C for 30 min) and sterilized (121 °C for 20 min) quail, pheasant, partridge, and guinea fowl meats was assayed under the amplification conditions described in this work. As can be seen in Fig. 3, DNA extracted from sterilized tissues exhibits a typical smear pattern of nucleic acid degradation, whereas DNA of raw and pasteurized samples appears more intact and is of high molecular weight. However, PCR results indicate effective amplification of the desired DNA segments in all raw and heat-treated samples, confirming the ability of the PCR to amplify relatively short segments in highly damaged DNA (Fig. 4).

The detection limit of the assay for the species analyzed, was evaluated by PCR amplification of DNA obtained from binary muscle mixtures containing 100%, 25%, 10%, 5%, 1%, and 0.1% (wt/wt) of each target species in chicken. To confirm the absence of PCR inhibition, a multiplex PCR approach combining each species-specific primer pair with 18SEU-FW and 18SEU-REV endogenous primers was carried out. For all species, it was observed that the lower the percentage of the target meat in the admixture, the fainter the band obtained in the PCR with the corresponding specific



**Fig. 3.** Electrophoretic analysis of total genomic DNA extracted from: (A) quail, (B) pheasant, (C) red-legged partridge, and (D) guinea fowl meats. Samples correspond to: raw (lane 1), pasteurized at 72 °C for 30 min (lane 2), and sterilized at 121 °C for 20 min (lane 3) meats. 2 µL of the total DNA extracted were loaded.



**Fig. 4.** Electrophoretic analysis of the 12S rRNA amplification products obtained using (A) quail, (B) pheasant, (C) partridge, and (D) guinea fowl species-specific primers. Samples correspond to raw (lane 1), pasteurized at 72 °C for 30 min (lane 2), and sterilized at 121 °C for 20 min (lane 3) meats. M, molecular weight marker 1 kb plus DNA ladder (GibcoBRL). C-, negative control.



primers (Fig. 5). The detection limit (lowest percentage producing visible DNA amplifications) of the assay was set on 0.1% for the four species-specific primers, either on raw (Fig. 5) or sterilized binary mixtures (results not shown).

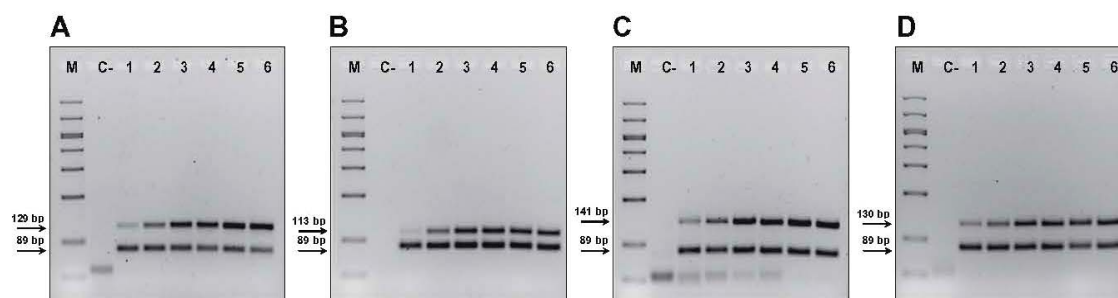
Satisfactory PCR results were also accomplished when several commercial meat products from quail, pheasant, partridge, and guinea fowl were analyzed with the species-specific primer pairs designed in this work (Table 3). These results indicate the capability of the PCR technique developed to selectively amplify the desired DNA segments from the avian meats analyzed in this study.

The vast majority of PCR applications that use specific primers for meat species identification published to date, are focused in domestic species such as cattle, sheep, goat, swine, turkey, chicken, duck, or goose (Colgan et al., 2001; Colombo, Marchisio, Pizzini, & Cantoni, 2002; Hird, Goodier, & Hill, 2003; Dalmasso et al., 2004; Di Pinto, Forte, Conversano, & Tantillo, 2005; Kesmen et al., 2007; Martín et al., 2007). A few number of works have been developed for the identification of game species such as red deer, fallow deer,

roe deer, chamois, pyrenean ibex, and mouflon employing species-specific primers (Fajardo et al., 2007b, 2007c). However, lesser studies have been reported so far about game birds meat authentication employing PCR techniques. In this sense, there is only one study reported by Girish et al. (2007) focused in the differentiation of meats from quail, guinea fowl, chicken, turkey and duck by PCR-RFLP. To our knowledge, there are no reports on the use of species-specific primers for the differentiation of meat from quail, pheasant, partridge, and guinea fowl.

Compared with alternative techniques such as PCR-RFLP or PCR-sequencing, PCR using species-specific primers is cheaper, faster, and more appropriate for species identification in meat products submitted to different processing treatments and in the analysis of admixed meats (pates, minced meat products, etc.) including two or more species in their composition (Fajardo et al., 2007a).

It can be concluded that the PCR method described in this paper is specific and sensitive, and could be used in inspection programs



**Fig. 5.** Electrophoretic analysis of the PCR products obtained from binary mixtures of raw muscle from: (A) quail in chicken, (B) pheasant in chicken, (C) red-legged partridge in chicken, and (D) guinea fowl in chicken, using 12SCOT-FW/12SCOT-REV, 12SPHA-FW/12SPHA-REV, 12SALEC-FW/12SALEC-REV, and 12SNUM-FW/12SNUM-REV primers, respectively, combined with 18SEU-FW and 18SEU-REV primers. In all electrophoretic images lanes 1–6 are samples of binary mixtures containing 0.1%, 1%, 5%, 10%, 25%, and 100% of the target species, respectively. M, molecular weight marker 50–1000 bp ladder (Biomarker® Low, BioVentures, Inc.). C–, negative control.

**Table 3**

Results for the PCR analysis of commercial meat products from quail, pheasant, partridge, and guinea fowl using primers 12SCOT-FW/12SCOT-REV, 12SPHA-FW/12SPHA-REV, 12SALEC-FW/12SALEC-REV, and 12SNUM-FW/12SNUM-REV. Primers 18SEU-FW/18SEU-REV were used as positive control of the assay.

Animal species on the label	Type of product	12SCOT-FW 12SCOT-REV (bp)	12SPHA-FW 12SPHA-REV (bp)	12SALEC-FW 12SALEC-REV (bp)	12SNUM-FW 12SNUM-REV (bp)	18SEU-FW 18SEU-REV (bp)
Quail	Braised meat	129	— <sup>a</sup>	—	—	89
Quail	Pickled meat	129	—	—	—	89
Quail	Boned meat	129	—	—	—	89
Quail	Minced meat	129	—	—	—	89
Quail	Paté A	129	—	—	—	89
Quail	Paté B	129	—	—	—	89
Pheasant	Braised meat	—	113	—	—	89
Pheasant	Paté A	—	113	—	—	89
Pheasant	Paté B	—	113	—	—	89
Pheasant	Paté C	—	113	—	—	89
Pheasant	Paté D	—	113	—	—	89
Pheasant	Paté E	—	113	—	—	89
Partridge	Braised meat	—	—	141	—	89
Partridge	Pickled meat A	—	—	141	—	89
Partridge	Pickled meat B	—	—	141	—	89
Partridge	Pickled meat C	—	—	141	—	89
Partridge	Boned meat	—	—	141	—	89
Partridge	Paté A	—	—	141	—	89
Partridge	Paté B	—	—	141	—	89
Partridge	Paté C	—	—	141	—	89
Partridge	Paté D	—	—	141	—	89
Partridge	Paté E	—	—	141	—	89
Partridge	Paté F	—	—	141	—	89
Guinea fowl	Braised meat	—	—	—	130	89
Guinea fowl	Minced meat	—	—	—	130	89
Guinea fowl	Paté A	—	—	—	130	89

<sup>a</sup> Means no amplification of the PCR product.

to enforce labelling regulation of game bird meat products, thereby protecting both producers and consumers against meat adulteration and misrepresentation.

### Acknowledgements

This study was supported by Grant No. AGL 2007-60077 from the Ministerio de Educación y Ciencia of Spain and the Programa de Vigilancia Sanitaria S-0505/AGR/000265 from the Comunidad de Madrid (Spain). María Rojas is recipient of a fellowship from the Ministerio de Educación y Ciencia (Spain).

We are indebted to Dr. Santiago Lavin González (Facultad de Veterinaria, Universidad Autónoma de Barcelona), Dr. Juan José Negro Balmaseda (Estación Biológica de Doñana, Sevilla), and Dra. Susana Dunner (Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid) for kindly supplying capercaillie, red-legged partridge, and barbary partridge samples.

### References

- Bellagamba, F., Moretti, V. M., Comincini, S., & Valfrè, F. (2001). Identification of species in animal feedstuffs by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis of mitochondrial DNA. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 3775–3781.
- Colgan, S., O'Brien, L., Maher, M., Shilton, N., McDonnell, K., & Ward, S. (2001). Development of a DNA-based assay for species identification in meat and bone meal. *Food Research International*, 34, 409–414.
- Colombo, F., Marchisio, E., Pizzini, A., & Cantoni, C. (2002). Identification of the goose species (*Anser anser*) in Italian "mortara" salami by DNA sequencing and a polymerase chain reaction with an original primer pair. *Meat Science*, 61, 291–294.
- Dalmaso, A., Fontanella, E., Piatti, P., Civera, T., Rosatti, S., & Bottero, M. T. (2004). A multiplex PCR assay for the identification of animal species in feedstuffs. *Molecular and Cellular Probes*, 18, 81–87.
- Di Pinto, A., Forte, V. T., Conversano, M. C., & Tantillo, G. M. (2005). Duplex polymerase chain reaction for detection of pork meat in horse meat fresh sausages from Italian retail sources. *Food Control*, 16, 391–394.
- Fajardo, V., González, I., López-Calleja, I., Martín, I., Hernández, P. E., García, T., & Martín, R. (2006). PCR-RFLP authentication of meats from red deer (*Cervus elaphus*), fallow deer (*Dama dama*), roe deer (*Capreolus capreolus*), cattle (*Bos taurus*), sheep (*Ovis aries*), and goat (*Capra hircus*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 1144–1150.
- Fajardo, V., González, I., López-Calleja, I., Martín, I., Rojas, M., Hernández, P. E., García, T., & Martín, R. (2007b). Identification of meats from red deer (*Cervus elaphus*), fallow deer (*Dama dama*), and roe deer (*Capreolus capreolus*) using polymerase chain reaction targeting specific sequences from the mitochondrial 12S rRNA gene. *Meat Science*, 76, 234–240.
- Fajardo, V., González, I., López-Calleja, I., Martín, I., Rojas, M., Hernández, P. E., García, T., & Martín, R. (2007c). PCR identification of meats from chamois (*Rupicapra rupicapra*), pyrenean ibex (*Capra pyrenaica*), and mouflon (*Ovis ammon*) targeting specific sequences from the mitochondrial D-loop region. *Meat Science*, 76, 644–652.
- Fajardo, V., González, I., López-Calleja, I., Martín, I., Rojas, M., Pavón, M. A., Hernández, P. E., García, T., & Martín, R. (2007a). Analysis of mitochondrial DNA for authentication of meats from chamois (*Rupicapra rupicapra*), pyrenean ibex (*Capra pyrenaica*), and mouflon (*Ovis ammon*) by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism. *Journal of AOAC International*, 90, 179–186.
- Girish, P. S., Anjaneyulu, A. S. R., Viswas, K. N., Anand, M., Rajkumar, N., Shivakumar, B. M., & Sharma, B. (2004). Sequence analysis of mitochondrial 12S rRNA gene can identify meat species. *Meat Science*, 66, 551–556.
- Girish, P. S., Anjaneyulu, A. S. R., Viswas, K. N., Santhosh, F. H., Bhilegaonkar, K. N., Agarwal, R. K., Kondaiah, N., & Nagappa, K. (2007). Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism of mitochondrial 12S rRNA gene: A simple method for identification of poultry meat species. *Veterinary Research Communications*, 31, 447–455.
- Girish, P. S., Anjaneyulu, A. S. R., Viswas, K. N., Shivakumar, B. M., Anand, M., Patel, M., & Sharma, B. (2005). Meat species identification by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) of mitochondrial 12S rRNA gene. *Meat Science*, 70, 107–112.
- Hird, H., Goodier, R., & Hill, M. (2003). Rapid detection of chicken and turkey in heated meat products using the polymerase chain reaction followed by amplicon visualisation with vista green. *Meat Science*, 65, 1117–1123.
- Kesmen, Z., Sahin, F., & Yetim, H. (2007). PCR assay for the identification of animal species in cooked sausages. *Meat Science*, 77, 649–653.
- Krcmar, P., & Rencova, E. (2005). Quantitative detection of species-specific DNA in feedstuffs and fish meals. *Journal of Food Protection*, 68, 1217–1221.
- La Neve, F., Civera, T., Mucci, N., & Bottero, M. T. (2008). Authentication of meat from game and domestic species by SNaPshot minisequencing analysis. *Meat Science*, 76, doi:10.1016/j.meatsci.2007.11.027.
- Martín, I., García, T., Fajardo, V., López-Calleja, I., Rojas, M., Hernández, P. E., González, I., & Martín, R. (2007). Mitochondrial markers for the detection of four duck species and the specific identification of muscovy duck in meat mixtures using the polymerase chain reaction. *Meat Science*, 76, 721–729.
- Partis, L., Croan, D., Guo, Z., Clark, R., Coldham, T., & Murby, J. (2000). Evaluation of a DNA fingerprinting method for determining the species origin of meats. *Meat Science*, 54, 369–376.
- Prado, M., Calo-Mata, P., Villa, T. G., Cepeda, A., & Barros-Velázquez, J. (2007). Co-amplification and sequencing of a cytochrome b fragment affecting the identification of cattle in PCR-RFLP food authentication studies. *Food Chemistry*, 105, 436–442.
- Rodríguez, M. A., García, T., González, I., Asensio, L., Mayoral, B., López-Calleja, I., Hernández, P. E., & Martín, R. (2003). Identification of goose, mule duck, chicken, turkey, and swine in foie gras by species-specific polymerase chain reaction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 1524–1529.
- Saini, M., Das, D. K., Dhara, A., Swarup, D., Yadav, M. P., & Gupta, P. K. (2007). Characterisation of peacock (*Pavo cristatus*) mitochondrial 12S rRNA sequence and its use in differentiation from closely related poultry species. *British Poultry Science*, 48, 162–166.
- Wolf, C., Rentsch, J., & Hübner, P. (1999). PCR-RFLP analysis of mitochondrial DNA: A reliable method for species identification. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 1350–1355.
- Zhang, J., Huang, H., Cai, Z., & Huang, L. (2007). Species identification in salted products of red snappers by semi-nested PCR-RFLP based on the mitochondrial 12S rRNA gene sequence. *Food Control*, 18, 1331–1336.



## Polymerase chain reaction assay for verifying the labeling of meat and commercial meat products from game birds targeting specific sequences from the mitochondrial D-loop region

M. Rojas, I. González, M. A. Pavón, N. Pegels, P. E. Hernández, T. García, and R. Martín<sup>1</sup>

*Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense, 28040 Madrid, Spain*

**ABSTRACT** A PCR assay was developed for the identification of meats and commercial meat products from quail (*Coturnix coturnix*), pheasant (*Phasianus colchicus*), partridge (*Alectoris* spp.), guinea fowl (*Numida meleagris*), pigeon (*Columba* spp.), Eurasian woodcock (*Scolopax rusticola*), and song thrush (*Turdus philomelos*) based on oligonucleotide primers targeting specific sequences from the mitochondrial D-loop region. The primers designed generated specific fragments of 96, 100, 104, 106, 147, 127, and 154 bp in length for quail, pheasant, partridge, guinea fowl, pigeon, Eurasian woodcock, and song thrush tissues, respectively.

The specificity of each primer pair was tested against DNA from various game and domestic species. In this work, satisfactory amplification was accomplished in the analysis of experimentally pasteurized (72°C for 30 min) and sterilized (121°C for 20 min) meats, as well as in commercial meat products from the target species. The technique was also applied to raw and sterilized muscular binary mixtures, with a detection limit of 0.1% (wt/wt) for each of the targeted species. The proposed PCR assay represents a rapid and straightforward method for the detection of possible mislabeling in game bird meat products.

**Key words:** species identification, game bird, D-loop, polymerase chain reaction

2010 Poultry Science 89:1021–1032

doi:10.3382/ps.2009-00217

## INTRODUCTION

Food authentication is an issue that has become increasingly important in recent years due to the drive for more accurate and truthful labeling (Wang, 2009). Especially in the case of meat products, consumers want to be protected from falsely labeled food that may contain unknown or less desirable meat species. As a result, there has been considerable research effort directed toward the development of fast and accurate methods to identify the species of meat present in a food sample (Sawyer et al., 2003). The application of these methods in food regulatory control should facilitate the determination of adulterated and undeclared species compositions, would help to protect both consumers and producers from frauds, and also would help to avoid possible illegal sale of meat from protected species (Peter et al., 2004).

Game bird meat and derived products are often targets for fraudulent labeling due to the high commercial value associated with these products. In the last few

years, there has been a move toward large-scale production of game birds such as quail, pheasant, or partridge using modern husbandry techniques, which has resulted in a greater availability of game bird meat and a proliferation of marinade, boned, minced, and filleted products containing meat from these species (Hird et al., 2005). Such practices of processing make it difficult to identify the species involved because the external features by which species are usually identified are lost, thereby increasing the opportunities for substitution particularly when the products are mixed with spices and other ingredients (Rodríguez et al., 2004; Schlumpberger, 2004). Therefore, it is necessary to develop and apply rapid and accurate markers to ensure game bird species identification in meat and meat products.

Several analytical methods are currently available for meat species identification. Among them, DNA-based methods have been well received because of the relative stability of the DNA molecule under extreme conditions and its efficient amplification by PCR (Zhang et al., 2007). Most of the PCR approaches to determine species identity are based on the amplification of relatively long DNA fragments using conserved mitochondrial or nuclear DNA primers, followed by sequencing (Girish et al., 2004) or RFLP of the amplicons obtained (Sun and Lin, 2003; Rojas et al., 2008, 2009). However, these

©2010 Poultry Science Association Inc.

Received April 30, 2009.

Accepted February 1, 2010.

<sup>1</sup>Corresponding author: rmartins@vet.ucm.es



techniques are not always suitable for the analysis of heat-treated meat products because thermal effect may cause fragmentation of DNA to just a few hundred base pairs leading to difficulties in obtaining PCR amplification of long fragments (Wolf and Lüthy, 2001). By contrast, PCR using species-specific primers directed to short DNA fragments offers an excellent alternative for the analysis of processed meat products because this approach allows direct species identification of the target species without the need for further sequencing or digestion of the PCR products with restriction enzymes (Fajardo et al., 2007a). In this context, a large number of reports describe the use of species-specific primers for the identification of a wide range of commercial meat species (Rodríguez et al., 2003; Che-Man et al., 2007; Fajardo et al., 2007a,b; Kesmen et al., 2007; Fujimura et al., 2008). However, the range of assays available for the detection of less commonly used meat species such as game birds is relatively limited (Chisholm et al., 2008; Rojas et al., 2008, 2009).

In this work, we describe a PCR method using specific primers for the identification of meat and commercial meat products from quail (*Coturnix coturnix*), pheasant (*Phasianus colchicus*), partridge (*Alectoris* spp.), guinea fowl (*Numida meleagris*), pigeon (*Columba* spp.), Eurasian woodcock (*Scolopax rusticola*), and song thrush (*Turdus philomelos*). The assay is based on the selective amplification of mitochondrial D-loop sequences from the selected species.

## MATERIALS AND METHODS

### Selection and Preparation of Meat Samples

Authentic muscle samples of quail (*Coturnix coturnix*), pheasant (*Phasianus colchicus*), red-legged partridge (*Alectoris rufa*), guinea fowl (*Numida meleagris*), Eurasian woodcock (*Scolopax rusticola*), wood-pigeon (*Columba palumbus*), and song thrush (*Turdus philomelos*), were provided by Antonio de Miguel (Madrid, Spain). Red-legged partridge samples were also obtained from the Estación Biológica de Doñana (Sevilla, Spain) and from Hermanos Sainz (Madrid, Spain). Chukar partridge (*Alectoris chukar*) meat samples were provided by Hermanos Sainz. Barbary partridge (*Alectoris barbara*) meat samples were obtained from the Department of Animal Production (Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense, Madrid, Spain). Common pigeon (*Columba livia*) meat samples were provided by Industria del Pichón Bravío (Valladolid, Spain). Capercaillie (*Tetrao urogallus*) meat samples were obtained from the Department of Animal Pathology (Facultad de Veterinaria, Universidad Autónoma de Barcelona, Spain). Chicken (*Gallus gallus*), turkey (*Meleagris gallopavo*), Muscovy duck (*Cairina moschata*), and goose (*Anser anser*) meat samples were purchased from several retail markets and local abattoirs (Madrid, Spain). Muscle samples from cattle (*Bos taurus*), sheep (*Ovis aries*), goat (*Capra hircus*), swine

(*Sus scrofa domestica*), red deer (*Cervus elaphus*), fallow deer (*Dama dama*), roe deer (*Capreolus capreolus*), chamois (*Rupicapra rupicapra*), mouflon (*Ovis ammon*), and Pyrenean ibex (*Capra pyrenaica*) were obtained from several Spanish abattoirs and meat-cutting installations. All specimens were morphologically identified by trained veterinarians before obtaining the samples.

Fresh muscle portions from the selected specimens were processed immediately or stored frozen at  $-20^{\circ}\text{C}$  until use. Quail, pheasant, partridge, guinea fowl, pigeon, Eurasian woodcock, and song thrush meats were also analyzed after being subjected to experimental pasteurization ( $72^{\circ}\text{C}$  for 30 min) and sterilization ( $121^{\circ}\text{C}$  for 20 min) treatments.

Binary mixtures of quail, pheasant, partridge, guinea fowl, pigeon, Eurasian woodcock, or song thrush in a chicken meat matrix were prepared using raw muscles from the selected species. For each meat mixture, different percentages ranging from 50 to 0.1% (wt/wt) of the target species were prepared to a final weight of 100 g. Forty milliliters of sterile PBS (136 mM NaCl, 1.4 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 8.09 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ , and 2.6 mM KCl, pH 7.2) was added to the binary mixtures and they were homogenized with a blender (Sunbeam-Oster, Delray Beach, FL). Fifty grams of each mixture was sterilized at  $121^{\circ}\text{C}$  for 20 min. Raw and sterilized binary meat mixtures were processed directly or stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  until use.

Several commercial meat products from quail, pheasant, partridge, guinea fowl, pigeon, Eurasian woodcock, and song thrush species purchased from different retail markets (Madrid, Spain) were also included in the analysis.

### DNA Extraction

Total DNA was extracted from meat using a Wizard DNA Clean-up System Kit (Promega Corp., Madison, WI) as described in a previous work (Rojas et al., 2008). Deoxyribonucleic acid concentration was measured with a NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop Technologies Inc., Montchanin, DE).

The DNA extracted from raw and processed tissues was electrophoresed in a 1% D1 Low EEO (Hispanlab S.A., Torrejón, Spain) agarose gel containing  $1\text{ }\mu\text{g/mL}$  of ethidium bromide in Tris-acetate buffer (0.04 M Tris-acetate and 0.001 M EDTA, pH 8.0) for 30 min at 110 V. Total DNA was visualized by UV transillumination using a Geldoc 1000 UV Fluorescent Gel Documentation System-PC (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA).

### Amplification and Sequencing of Conserved Fragments in the D-Loop Region from Different Game Bird and Domestic Meats

The set of primers used for amplification consisted of 2 pairs of oligonucleotides: DLOOPSHORT-FW/

## IDENTIFICATION OF GAME BIRD MEAT

1023

DLOOPSHORT-REV, designed in a previous work for the development of a PCR-RFLP technique (Rojas et al., 2009), and DLOOPLONG-FW/DLOOPLONG-REV, designed in the present work. These primers flanked D-loop regions of approximately 310 and 485 to 600 bp, respectively, and were designed based on sequences available in the GenBank-European Molecular Biology Laboratory database for various avian species using EMBOSS software package version 2.2.0 and Primer Express 2.0 software (Perkin-Elmer/Applied Biosystems Division, Foster City, CA).

Double-stranded amplifications were performed in a total volume of 25  $\mu$ L. Each reaction mixture contained 100 ng of template DNA, 2 mM  $MgCl_2$ , 200  $\mu$ M of each deoxynucleoside triphosphate, 10 pmol of each primer, and 1 unit of *Tth* DNA polymerase (Biotools, Madrid, Spain) in a reaction buffer containing 75 mM Tris-HCl, pH 9.0; 50 mM KCl; 20 mM  $(NH_4)_2SO_4$ ; and 0.001% BSA.

Polymerase chain reaction amplification was carried out in a Progene thermal cycler (Technique Ltd., Cambridge, UK). Forty cycles of amplification with the following step-cycle profile were programmed: strand denaturation at 93°C for 30 s, primer annealing at 50°C (for DLOOPSHORT-FW/DLOOPSHORT-REV primers) or 55°C (for DLOOPLONG-FW/DLOOPLONG-REV primers) for 30 s, and primer extension at 72°C for 45 s. An initial denaturation at 93°C for 2 min and a final extension at 72°C for 5 min improved the product yield. Polymerase chain reaction products (10  $\mu$ L) were mixed with 2  $\mu$ L of gel loading solution (Sigma, St. Louis, MO) and were loaded in a 2% D1 Low EEO (Hispanlab S.A.) agarose gel containing 1  $\mu$ g/mL of ethidium bromide in Tris-acetate buffer (0.04 M Tris-acetate and 0.001 M EDTA, pH 8.0). Electrophoretic separation was performed at 100 V for 30 min. The resulting DNA fragments were visualized by UV transillumination and were analyzed using a Geldoc 1000 UV Fluorescent Gel Documentation System-PC (Bio-Rad Laboratories).

Mitochondrial D-loop region amplicons were subsequently purified and sequenced as described in a previous work (Rojas et al., 2008). The DLOOPSHORT-FW/DLOOPSHORT-REV and DLOOPLONG-FW/DLOOPLONG-REV oligonucleotides were used in the sequencing reactions.

### **Design of Avian-Specific Primers and PCR Amplification of the Selected DNA Fragments from Quail, Pheasant, Partridge, Guinea Fowl, Pigeon, Eurasian Woodcock, and Song Thrush**

To accomplish the design, D-loop sequences obtained from quail (FM164774), pheasant (FM164775), red-legged partridge (FM164776), chukar partridge (FM164777), barbary partridge (FN377855), guinea fowl (FM164778), common pigeon (FN376876), wood-

pigeon (FM164781), Eurasian woodcock (FM164780), song thrush (FN376877), chicken (FM164782), turkey (FM164783), Muscovy duck (FM164784), and goose (FM164785) with DLOOPSHORT-FW/DLOOPSHORT-REV primers were aligned and compared. Based upon detailed analysis and comparison of the aligned mitochondrial D-loop sequences, 3 primer pairs were designed for the specific identification of pigeon, Eurasian woodcock, and song thrush species. On the other hand, the alignment and comparison of the sequences obtained with DLOOPLONG-FW/DLOOPLONG-REV primers from quail (FN376866), pheasant (FN376867), red-legged partridge (FN376868), chukar partridge (FN376869), barbary partridge (FN376870), guinea fowl (FN376871), chicken (FN376872), turkey (FN376873), Muscovy duck (FN376874), and goose (FN376875) allowed the design of species-specific primers for quail, pheasant, partridge, and guinea fowl. The primer sets COTDLOOP-FW/COTDLOOP-REV, PHADLOOP-FW/PHADLOOP-REV, ALECDLOOP-FW/ALECDLOOP-REV, NUMDLOOP-FW/NUMDLOOP-REV, COLDLOOP-FW/COLDLOOP-REV, SCODLOOP-FW/SCODLOOP-REV, and TURDLOOP-FW/TURDLOOP-REV were expected to yield specific DNA fragments of 96, 100, 104, 106, 147, 127, and 154 bp in the D-loop region of quail, pheasant, partridge, guinea fowl, pigeon, Eurasian woodcock, and song thrush, respectively. In addition, 18SpEUDIR/18SpEUINV and 18SEU-FW/18SEU-REV primers based on conserved nuclear 18S rRNA gene sequences available in the GenBank-European Molecular Biology Laboratory databases for various avian and mammal species were used as positive control of the assay. These primers were expected to amplify conserved fragments of 141 and 89 bp, respectively, of the 18S rRNA gene in all of the analyzed species. The sequence and description of the primers used in this work is summarized in Table 1.

Deoxyribonucleic acid amplifications were carried out in a final volume of 25  $\mu$ L containing 10 ng of template DNA, 2 mM  $MgCl_2$ , 200  $\mu$ M of each deoxynucleoside triphosphate, 10 pmol (quail, partridge, and song thrush primers) or 5 pmol (pheasant, guinea fowl, pigeon, and Eurasian woodcock primers), and 1 unit of *Tth* DNA polymerase (Biotools) in a reaction buffer containing 75 mM Tris-HCl, pH 9.0; 50 mM KCl; 20 mM  $(NH_4)_2SO_4$ ; and 0.001% BSA. Forty amplification cycles were performed with the following step-cycle profile: strand denaturation at 93°C for 30 s; primer annealing at 65°C (for quail, guinea fowl, and Eurasian woodcock), 63°C (for pigeon and song thrush), 60°C (for pheasant), or 55°C (for partridge) for 30 s; and primer extension at 72°C for 45 s. The last extension step was 5 min longer. An initial denaturation at 93°C for 2 min was carried out to improve the final result. Positive control amplifications were set using 5 pmol of 18SpEUDIR/18SpEUINV or 18SEU-FW/18SEU-REV primers combined in duplex PCR with each species-specific primer pair.



**Table 1.** Deoxyribonucleic acid sequences of the primers used in this study

Primer	Length (bp)	Sequence (5' to 3')	Description
DLOOPLONG-FW	19	CTCTGGTTCCTCGGTCAGG	Conserved forward primer 1
DLOOPLONG-REV	26	GGTTGGGTAGTGGAGTTTCTCTAATA	Conserved reverse primer 1
DLOOPSHORT-FW	17	TTGCGCCTCTGGTTCCCT	Conserved forward primer 2
DLOOPSHORT-REV	23	GAGACAAAGTGCATCAGTGTCAA	Conserved reverse primer 2
18SpEUDIR-FW	29	GGTAGTGACGAAAAATAACAATACAGGAC	Positive control forward 1
18SpEUIINV-REV	25	ATACGCTATTGGAGCTGGAATTACC	Positive control reverse 1
18SEU-FW	28	GCTCATTAATCAGTTATGGTTCCTTTG	Positive control forward 2
18SEU-REV	26	CGTCGGCATGTATTAGCTCTAGAATT	Positive control reverse 2
COTDLOOP-FW	22	AAACTCACC GCACAAATACCCCT	Quail forward primer
COTDLOOP-REV	31	AGTGGCGTTTCTCTAATAATTATATAAACGT	Quail reverse primer
PHADLOOP-FW	27	TAACTAAAATTACCGCATAAAAACCCC	Pheasant forward primer
PHADLOOP-REV	29	GTGGAGTTTCTCTAATAAAAGTGTTCAT	Pheasant reverse primer
ALECDLOOP-FW	26	CAAAATAACATATAAACTACCGCATA	Partridge forward primer
ALECDLOOP-REV	26	TGGAGTTTCTCTAATAGTGTGTAA	Partridge reverse primer
NUMDLOOP-FW	31	AATTATTACAAACAATCAACACCTTAACAT	Guinea fowl forward primer
NUMDLOOP-REV	29	GGAGTTTCTCTAATAATTTGGGCTAAAGT	Guinea fowl reverse primer
COLDLOOP-FW	21	GTCGGGGTCATACCTCACCAT	Pigeon forward primer
COLDLOOP-REV	28	ACGCATAATTTAGGTGCAGATAATAAAC	Pigeon reverse primer
SCODLOOP-FW	21	ATCTGGTTCGCTATATGCCCC	Eurasian woodcock forward primer
SCODLOOP-REV	22	TAGATTGTATTACCCGCTGCA	Eurasian woodcock reverse primer
TURDLOOP-FW	19	ATTCCGACCGTCTCTGCAC	Song thrush forward primer
TURDLOOP-REV	25	TACGATGAAACCATGACAAGTTATG	Song thrush reverse primer

Polymerase chain reaction products (10  $\mu$ L) were electrophoresed in a 3.5% MS8 (Hispanlab S.A.) agarose gel. Each agarose gel contained 1  $\mu$ g/mL of ethidium bromide in Tris-acetate buffer (0.04 M Tris-acetate and 0.001 M EDTA, pH 8.0). Electrophoretic separation was performed at 90 V for 60 min and the resulting DNA fragments were visualized by UV transillumination and analyzed using a Geldoc 1000 UV Fluorescent Gel Documentation System-PC (Bio-Rad Laboratories).

## RESULTS AND DISCUSSION

The increasing demand for information on the origin and composition of processed meat products has propelled the development of accurate and powerful analysis methods. Among them, PCR has been successfully applied for the identification of different animal species in meat products, including cooked products (Di Pinto et al., 2005). In this work, specific primers were developed on the highly variable mitochondrial D-loop region for the specific identification of meats and commercial meat products from quail (*Coturnix coturnix*), pheasant (*Phasianus colchicus*), partridge (*Alectoris* spp.), guinea fowl (*Numida meleagris*), pigeon (*Columba* spp.), Eurasian woodcock (*Scolopax rusticola*), and song thrush (*Turdus philomelos*).

Mitochondrial DNA has been commonly used for species identification because its presence in multiple copies per cell increases the probability of achieving a positive result even in the case of samples suffering severe DNA fragmentation due to intense processing conditions. In addition, it has a relatively high mutation rate as compared with nuclear DNA, enough to allow discrimination of even closely related species (Pascoal et al., 2004; Fujimura et al., 2008). The mitochondrial

D-loop region was selected in this study as the target sequence for species identification because it has the highest substitution rate of all mitochondrial genes and is the most rapidly evolving region of the mitochondrial genome. Moreover, the high number of sequences currently available in the databases facilitates the design of specific primers (Montiel-Sosa et al., 2000; Fajardo et al., 2007c).

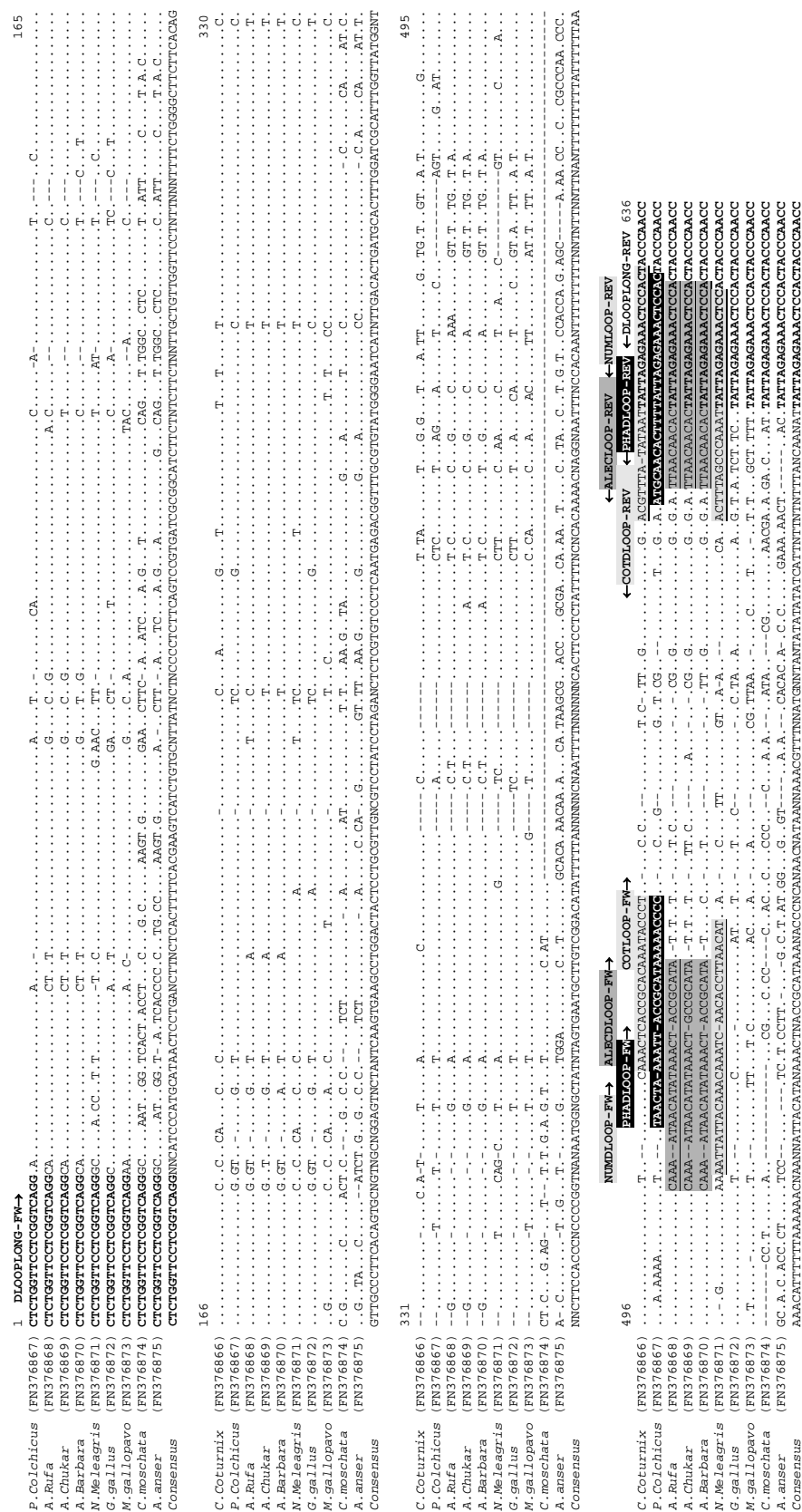
The detailed study of mitochondrial D-loop sequences from quail, pheasant, red-legged partridge, chukar partridge, barbary partridge, guinea fowl, Eurasian woodcock, woodpigeon, common pigeon, and song thrush obtained with DLOOPSHORT-FW/DLOOPSHORT-REV primers allowed the design of specific primer pairs for pigeon (COLDLOOP-FW/COLDLOOP-REV), Eurasian woodcock (SCODLOOP-FW/SCODLOOP-REV), and song thrush (TURDLOOP-FW/TURDLOOP-REV) (Figure 1). Nevertheless, due to the high degree of sequence similarity between the selected species, it was not possible to design species-specific primers for quail, pheasant, partridge, and guinea fowl in this short fragment (310 bp). For this reason, a longer polymorphic DNA region potentially suitable for further species differentiation was amplified and sequenced with DLOOPLONG-FW/DLOOPLONG-REV conserved primers. Bands obtained after PCR amplification with this set of primers ranged in size (from 485 to 600 bp) depending on the species (results not shown), according to the finding that the control region is primarily responsible for the observed variation in length of the vertebrate mitochondrial genome. The detailed study of the sequence multialignment permitted the design of specific primer pairs for quail (COTDLOOP-FW/COTDLOOP-REV), pheasant (PHADLOOP-FW/PHADLOOP-REV), partridge (ALECDLOOP-FW/ALECDLOOP-REV), and guinea

## IDENTIFICATION OF GAME BIRD MEAT

1025

	1	DLOOPSHORT-FW→	SCODLOOP-FW→	COLDLOOP-FW→	TURDLOOP-FW→	165
C.coturnix (FM164774)	TTGGGCTCTGGTTCCT	CG...CC.G.A...ATC.GAC.T...	CG...CC.G.A...ATC.GAC.T...	CG...CC.G.A...ATC.GAC.T...	CG...CC.G.A...ATC.GAC.T...	TTGGGCTCTGGTTCCT
P.colchicus (FM164775)	TTGGGCTCTGGTTCCT	AA...A.C.A...AAC.T...	AA...A.C.A...AAC.T...	AA...A.C.A...AAC.T...	AA...A.C.A...AAC.T...	TTGGGCTCTGGTTCCT
A.rufa (FM164776)	TTGGGCTCTGGTTCCT	CA...A.C.A...ACT.T...	CA...A.C.A...ACT.T...	CA...A.C.A...ACT.T...	CA...A.C.A...ACT.T...	TTGGGCTCTGGTTCCT
A.chukar (FM164777)	TTGGGCTCTGGTTCCT	CA...A.C.A...ACT.T...	CA...A.C.A...ACT.T...	CA...A.C.A...ACT.T...	CA...A.C.A...ACT.T...	TTGGGCTCTGGTTCCT
N.barbara (FM164778)	TTGGGCTCTGGTTCCT	CA...A.C.A...ACT.T...	CA...A.C.A...ACT.T...	CA...A.C.A...ACT.T...	CA...A.C.A...ACT.T...	TTGGGCTCTGGTTCCT
N.meleagris (FM164779)	TTGGGCTCTGGTTCCT	GC...AA.CT.GCA.T...CA...T...	GC...AA.CT.GCA.T...CA...T...	GC...AA.CT.GCA.T...CA...T...	GC...AA.CT.GCA.T...CA...T...	TTGGGCTCTGGTTCCT
C.livia (FM164780)	TTGGGCTCTGGTTCCT	GC...AA.CT.GCA.T...CA...T...	GC...AA.CT.GCA.T...CA...T...	GC...AA.CT.GCA.T...CA...T...	GC...AA.CT.GCA.T...CA...T...	TTGGGCTCTGGTTCCT
S.palladius (FM164781)	TTGGGCTCTGGTTCCT	GC...AA.CT.GCA.T...CA...T...	GC...AA.CT.GCA.T...CA...T...	GC...AA.CT.GCA.T...CA...T...	GC...AA.CT.GCA.T...CA...T...	TTGGGCTCTGGTTCCT
S.rusticola (FM164782)	TTGGGCTCTGGTTCCT	GC...AA.CT.GCA.T...CA...T...	GC...AA.CT.GCA.T...CA...T...	GC...AA.CT.GCA.T...CA...T...	GC...AA.CT.GCA.T...CA...T...	TTGGGCTCTGGTTCCT
G.gallus (FM164783)	TTGGGCTCTGGTTCCT	GC...AA.CT.GCA.T...CA...T...	GC...AA.CT.GCA.T...CA...T...	GC...AA.CT.GCA.T...CA...T...	GC...AA.CT.GCA.T...CA...T...	TTGGGCTCTGGTTCCT
M.gallinago (FM164784)	TTGGGCTCTGGTTCCT	GC...AA.CT.GCA.T...CA...T...	GC...AA.CT.GCA.T...CA...T...	GC...AA.CT.GCA.T...CA...T...	GC...AA.CT.GCA.T...CA...T...	TTGGGCTCTGGTTCCT
C.moschata (FM164785)	TTGGGCTCTGGTTCCT	GC...AA.CT.GCA.T...CA...T...	GC...AA.CT.GCA.T...CA...T...	GC...AA.CT.GCA.T...CA...T...	GC...AA.CT.GCA.T...CA...T...	TTGGGCTCTGGTTCCT
A.anser (FM164786)	TTGGGCTCTGGTTCCT	GC...AA.CT.GCA.T...CA...T...	GC...AA.CT.GCA.T...CA...T...	GC...AA.CT.GCA.T...CA...T...	GC...AA.CT.GCA.T...CA...T...	TTGGGCTCTGGTTCCT
Consensus	TTGGGCTCTGGTTCCT	GC...AA.CT.GCA.T...CA...T...	GC...AA.CT.GCA.T...CA...T...	GC...AA.CT.GCA.T...CA...T...	GC...AA.CT.GCA.T...CA...T...	TTGGGCTCTGGTTCCT
	166	←SCODLOOP-REV	←COLDLOOP-REV	←TURDLOOP-REV	←DLOOPSHORT-REV	330
C.coturnix (FM164774)	TTGGGCTCTGGTTCCT	CG...CC.G.A...ATC.GAC.T...	CG...CC.G.A...ATC.GAC.T...	CG...CC.G.A...ATC.GAC.T...	CG...CC.G.A...ATC.GAC.T...	TTGGGCTCTGGTTCCT
P.colchicus (FM164775)	TTGGGCTCTGGTTCCT	AA...A.C.A...AAC.T...	AA...A.C.A...AAC.T...	AA...A.C.A...AAC.T...	AA...A.C.A...AAC.T...	TTGGGCTCTGGTTCCT
A.rufa (FM164776)	TTGGGCTCTGGTTCCT	CA...A.C.A...ACT.T...	CA...A.C.A...ACT.T...	CA...A.C.A...ACT.T...	CA...A.C.A...ACT.T...	TTGGGCTCTGGTTCCT
A.chukar (FM164777)	TTGGGCTCTGGTTCCT	CA...A.C.A...ACT.T...	CA...A.C.A...ACT.T...	CA...A.C.A...ACT.T...	CA...A.C.A...ACT.T...	TTGGGCTCTGGTTCCT
N.barbara (FM164778)	TTGGGCTCTGGTTCCT	CA...A.C.A...ACT.T...	CA...A.C.A...ACT.T...	CA...A.C.A...ACT.T...	CA...A.C.A...ACT.T...	TTGGGCTCTGGTTCCT
N.meleagris (FM164779)	TTGGGCTCTGGTTCCT	GC...AA.CT.GCA.T...CA...T...	GC...AA.CT.GCA.T...CA...T...	GC...AA.CT.GCA.T...CA...T...	GC...AA.CT.GCA.T...CA...T...	TTGGGCTCTGGTTCCT
C.livia (FM164780)	TTGGGCTCTGGTTCCT	GC...AA.CT.GCA.T...CA...T...	GC...AA.CT.GCA.T...CA...T...	GC...AA.CT.GCA.T...CA...T...	GC...AA.CT.GCA.T...CA...T...	TTGGGCTCTGGTTCCT
S.palladius (FM164781)	TTGGGCTCTGGTTCCT	GC...AA.CT.GCA.T...CA...T...	GC...AA.CT.GCA.T...CA...T...	GC...AA.CT.GCA.T...CA...T...	GC...AA.CT.GCA.T...CA...T...	TTGGGCTCTGGTTCCT
S.rusticola (FM164782)	TTGGGCTCTGGTTCCT	GC...AA.CT.GCA.T...CA...T...	GC...AA.CT.GCA.T...CA...T...	GC...AA.CT.GCA.T...CA...T...	GC...AA.CT.GCA.T...CA...T...	TTGGGCTCTGGTTCCT
G.gallus (FM164783)	TTGGGCTCTGGTTCCT	GC...AA.CT.GCA.T...CA...T...	GC...AA.CT.GCA.T...CA...T...	GC...AA.CT.GCA.T...CA...T...	GC...AA.CT.GCA.T...CA...T...	TTGGGCTCTGGTTCCT
M.gallinago (FM164784)	TTGGGCTCTGGTTCCT	GC...AA.CT.GCA.T...CA...T...	GC...AA.CT.GCA.T...CA...T...	GC...AA.CT.GCA.T...CA...T...	GC...AA.CT.GCA.T...CA...T...	TTGGGCTCTGGTTCCT
C.moschata (FM164785)	TTGGGCTCTGGTTCCT	GC...AA.CT.GCA.T...CA...T...	GC...AA.CT.GCA.T...CA...T...	GC...AA.CT.GCA.T...CA...T...	GC...AA.CT.GCA.T...CA...T...	TTGGGCTCTGGTTCCT
A.anser (FM164786)	TTGGGCTCTGGTTCCT	GC...AA.CT.GCA.T...CA...T...	GC...AA.CT.GCA.T...CA...T...	GC...AA.CT.GCA.T...CA...T...	GC...AA.CT.GCA.T...CA...T...	TTGGGCTCTGGTTCCT
Consensus	TTGGGCTCTGGTTCCT	GC...AA.CT.GCA.T...CA...T...	GC...AA.CT.GCA.T...CA...T...	GC...AA.CT.GCA.T...CA...T...	GC...AA.CT.GCA.T...CA...T...	TTGGGCTCTGGTTCCT

**Figure 1.** Deoxyribonucleic acid sequence alignment of the D-loop region PCR products from quail (*Coturnix coturnix*, FM164774), pheasant (*Phasianus colchicus*, FM164775), red-legged partridge (*Alectoris rufa*, FM164776), chukar partridge (*Alectoris chukar*, FM164777), barbery partridge (*Alectoris barbara*, FM164778), guinea fowl (*Nemada melagris*, FM164779), common pigeon (*Coturnix kya*, FM164780), woodpigeon (*Columba palumbus*, FM164781), Eurasian woodcock (*Scolopax rusticola*, FM164782), song thrush (*Turdus philomelos*, FM164783), chicken (*Gallus gallus*, FM164784), turkey (*Meleagris gallopavo*, FM164785), Muscovy duck (*Cairina moschata*, FM164786), and goose (*Anser anser*, FM164787). Boldfaced nucleotides indicate the position of primers DLOOPSHORT-FW and DLOOPSHORT-REV used for sequencing. Primers COLDLOOP-FW/COLDLOOP-REV, SCODLOOP-FW/SCODLOOP-REV, and TURDLOOP-FW/TURDLOOP-REV are underlined and shaded.



**Figure 2.** Deoxyribonucleic acid sequences alignment of the D-loop region PCR products from quail (*Coturnix coturnix*, FN376866), pheasant (*Phasianus colchicus*, FN376867), red-legged partridge (*Alectoris rufa*, FN376868), chukar partridge (*Alectoris chukar*, FN376869), barbara partridge (*Alectoris barbara*, FN376870), guinea fowl (*Nyctea meleagris*, FN376871), chicken (*Gallus gallus*, FN376872), turkey (*Meleagris gallopavo*, FN376873), Muscovy duck (*Casina moschata*, FN376874), and geese (*Anser anser*, FN376875). Boldfaced nucleotides indicate the position of primers DLOOPLONG-FW and DLOOPLONG-REV used for sequencing. Primers COTDLOOP-FW/PHADLOOP-FW/PHADLOOP-REV, ALECDLOOP-FW/ALECDLOOP-REV, and NUMDLOOP-FW/NUMDLOOP-REV are underlined and shaded.

## IDENTIFICATION OF GAME BIRD MEAT

1027

**Table 2.** Specificity of the primer pairs designed for the specific detection of quail (COTDLOOP-FW/COTDLOOP-REV), pheasant (PHADLOOP-FW/PHADLOOP-REV), partridge (ALECDLOOP-FW/ALECDLOOP-REV), guinea fowl (NUMDLOOP-FW/NUMDLOOP-REV), pigeon (COLDLOOP-FW/COLDLOOP-REV), Eurasian woodcock (SCODLOOP-FW/SCODLOOP-REV), and song thrush (TURDLOOP-FW/TURDLOOP-REV) meats, using DNA from several avian and mammal species

Common name	Scientific name	COTDLOOP- FW/ COTDLOOP- REV	PHADLOOP- FW/ PHADLOOP- REV	ALECDLOOP- FW/ ALECDLOOP- REV	NUMDLOOP- FW/ NUMDLOOP- REV	COLDLOOP- FW/ COLDLOOP- REV	SCODLOOP- FW/ SCODLOOP- REV	TURDLOOP- FW/ TURDLOOP- REV	18SpEUDIR/ 18SpEUVN or 18SEU- FW/18SEU-REV <sup>1</sup>
Quail	<i>Coturnix coturnix</i>	96 bp	100 bp	—	—	—	—	—	+
Pheasant	<i>Phasianus colchicus</i>	—	—	—	—	—	—	—	+
Red-legged partridge	<i>Alectoris rufa</i>	—	—	106 bp	—	—	—	—	+
Chukar partridge	<i>Alectoris chukar</i>	—	—	106 bp	—	—	—	—	+
Barbary partridge	<i>Alectoris barbara</i>	—	—	106 bp	—	—	—	—	+
Guinea fowl	<i>Nyctala nyctala</i>	—	—	—	104 bp	—	—	—	+
Common pigeon	<i>Columba livia</i>	—	—	—	—	147 bp	—	—	+
Woodpigeon	<i>Columba palumbus</i>	—	—	—	—	147 bp	—	—	+
Eurasian woodcock	<i>Scotopax rusticola</i>	—	—	—	—	—	127 bp	—	+
Song thrush	<i>Turdus philomelos</i>	—	—	—	—	—	—	154 bp	+
Capercaillie	<i>Tetrao urogallus</i>	—	—	—	—	—	—	—	+
Chicken	<i>Gallus gallus</i>	—	—	—	—	—	—	—	+
Turkey	<i>Meleagris gallopavo</i>	—	—	—	—	—	—	—	+
Muscovy duck	<i>Cairina moschata</i>	—	—	—	—	—	—	—	+
Goose	<i>Anser anser</i>	—	—	—	—	—	—	—	+
Cattle	<i>Bos taurus</i>	—	—	—	—	—	—	—	+
Sheep	<i>Ovis aries</i>	—	—	—	—	—	—	—	+
Goat	<i>Capra hircus</i>	—	—	—	—	—	—	—	+
Swine	<i>Sus scrofa domestica</i>	—	—	—	—	—	—	—	+
Fallow deer	<i>Dama dama</i>	—	—	—	—	—	—	—	+
Roe deer	<i>Capreolus capreolus</i>	—	—	—	—	—	—	—	+
Red deer	<i>Cervus elaphus</i>	—	—	—	—	—	—	—	+
Chamois	<i>Rupicapra rupicapra</i>	—	—	—	—	—	—	—	+
Mouflon	<i>Ovis montanus</i>	—	—	—	—	—	—	—	+
Pyrenean ibex	<i>Capra pyrenaica</i>	—	—	—	—	—	—	—	+

<sup>1</sup>Primers 18SpEUDIR/18SEU-FW/18SEU-REV were used as positive control of the assay depending on the sizes of the species-specific amplicons.

<sup>2</sup>Means no amplification of the PCR product.

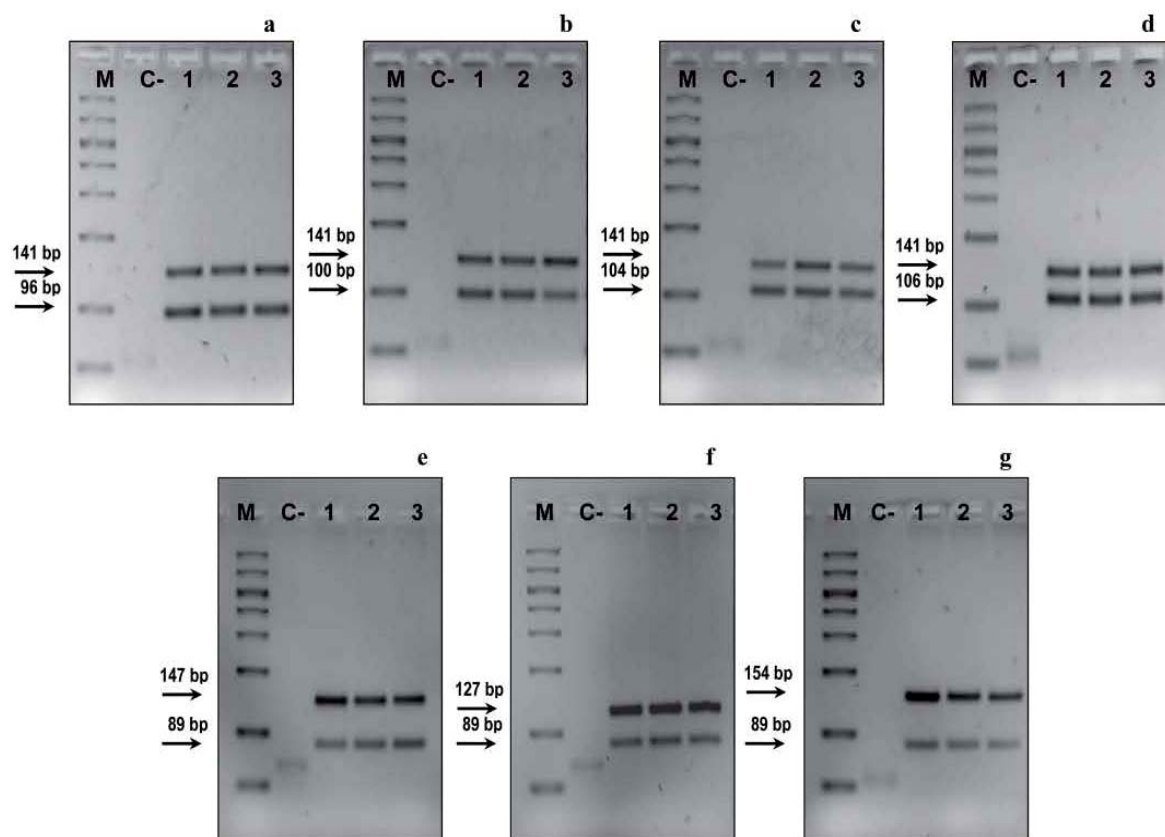
<sup>3</sup>Means amplification with the positive control primers.

fowl (NUMDLOOP-FW/NUMDLOOP-REV) (Figure 2).

Results of PCR amplifications indicated that the sizes of the amplicons obtained with the 7 species-specific primer pairs were as expected from sequence analysis. Specific DNA fragments of 96, 100, 104, 106, 147, 127, and 154 bp were successfully amplified with quail, pheasant, partridge, guinea fowl, pigeon, Eurasian woodcock, and song thrush primer sets, respectively, showing no amplification on DNA from the rest of the meat species analyzed (Table 2). Conserved partridge primers were designed to recognize red-legged partridge, chukar partridge, and barbary partridge, which are the most important commercialized partridge species. In the same way, pigeon primers were designed to recognize common pigeon and woodpigeon. Twenty specimens from every selected meat species were analyzed in the PCR assays, yielding consistent and reproducible DNA amplification bands. These results suggest an optimum specificity of the 7 primer pairs when tested for PCR amplification against a high number of game and domestic meat species distributed for human consumption. Demonstration of specificity against a large number of species is

very important because when a reduced number of species are used to assess the specificity of the assay, there is always a risk of finding cross-reactivity with untested close-related species, limiting the value of the assay for routine analysis (Martín et al., 2007).

A common problem of PCR-based methods is failure of DNA amplification due to the presence of inhibitory substances in the samples. Inhibition influences the outcome of PCR reaction by lowering or completely preventing the amplification. Thus, it is essential to include positive controls to avoid false-negative results. For this reason, positive control amplification was performed in each PCR experiment using 18SpEUDIR/18SpEUINV or 18SEU-FW/18SEU-REV conserved primers. These primers were combined in duplex PCR with each species-specific primer depending on the fragment sizes of the species-specific amplicons to differentiate the bands obtained in the agarose gel. In this sense, quail-, pheasant-, partridge-, and guinea fowl-specific primers were combined with 18SpEUDIR/18SpEUINV primers, whereas pigeon-, Eurasian woodcock-, and song thrush-specific primers were combined with 18SEU-FW/18SEU-REV oligonucleotides. These sets of prim-

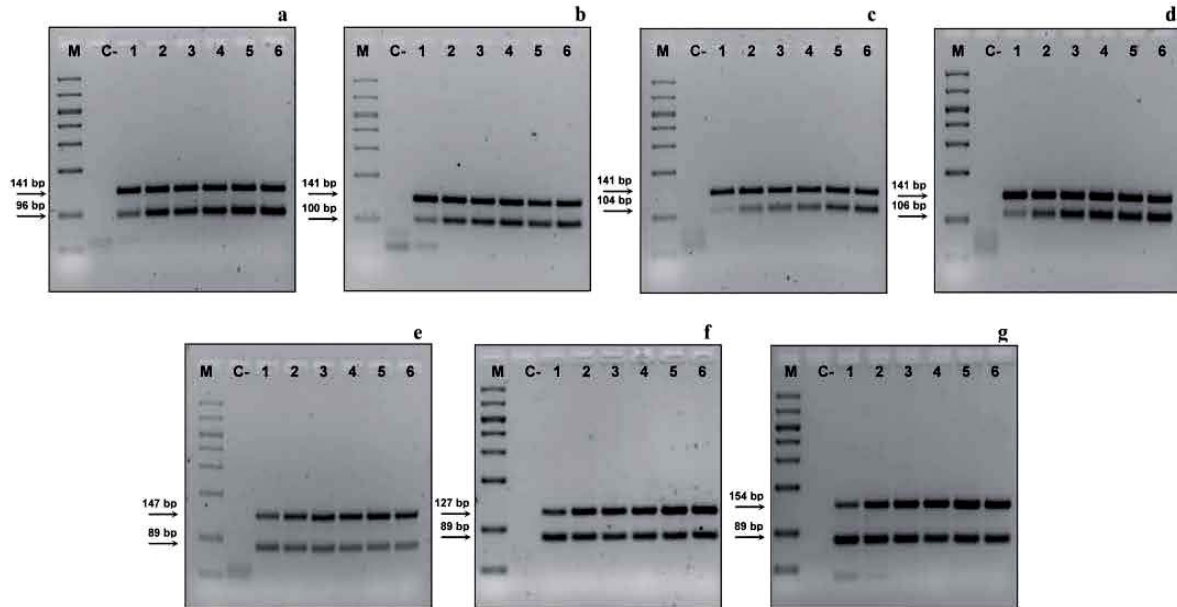


**Figure 3.** Electrophoretic analysis of the D-loop amplification products obtained using (a) quail, (b) pheasant, (c) partridge, (d) guinea fowl, (e) pigeon, (f) Eurasian woodcock, and (g) song thrush species-specific primers combined with 18SpEUDIR/18SpEUINV primers (quail, pheasant, partridge, and guinea fowl assays) or 18SEU-FW/18SEU-REV primers (pigeon, Eurasian woodcock, and song thrush assays). Samples correspond to raw (lane 1), pasteurized at 72°C for 30 min (lane 2), and sterilized at 121°C for 20 min (lane 3) meats. M = molecular weight marker 50- to 1,000-bp ladder (Biomarker Low, BioVentures Inc., Murfreesboro, TN); C- = negative control.

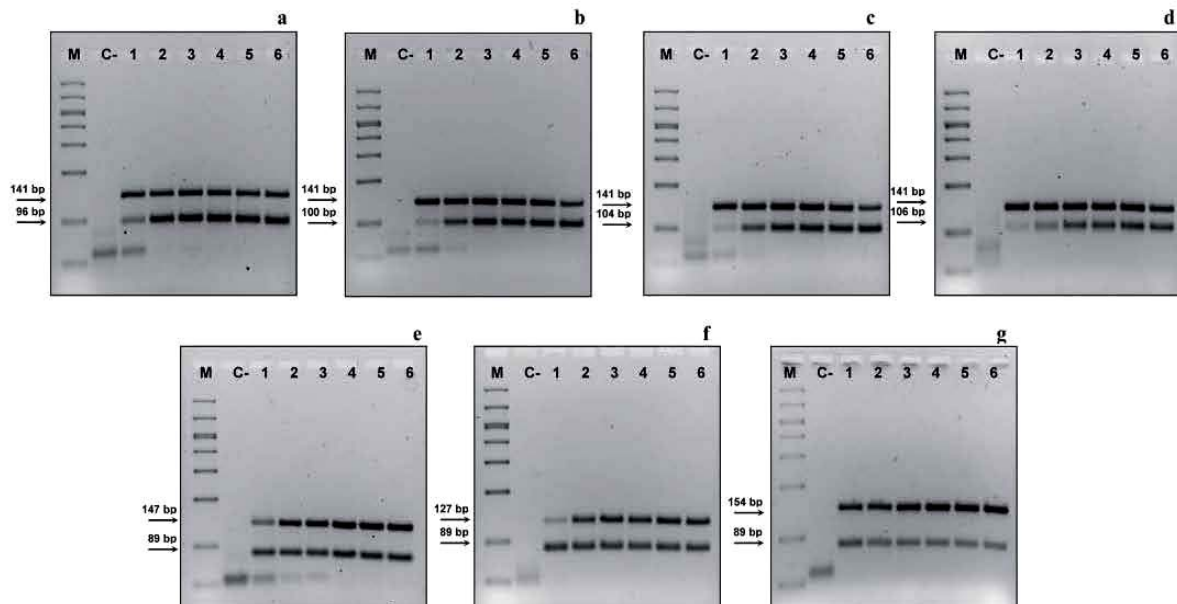


## IDENTIFICATION OF GAME BIRD MEAT

1029



**Figure 4.** Electrophoretic analysis of the PCR products obtained from binary mixtures of raw muscle from (a) quail in chicken, (b) pheasant in chicken, (c) red-legged partridge in chicken, (d) guinea fowl in chicken, (e) woodpigeon in chicken, (f) Eurasian woodcock in chicken, and (g) song thrush in chicken using COTDLOOP-FW/COTDLOOP-REV, PHADLOOP-FW/PHADLOOP-REV, ALECDLOOP-FW/ALECDLOOP-REV, NUMDLOOP-FW/NUMDLOOP-REV, COLDLOOP-FW/COLDLOOP-REV, SCODLOOP-FW/SCODLOOP-REV, and TURDLOOP-FW/TURDLOOP-REV primers, respectively, combined with 18SpEUDIR/18SpEUINV primers (quail, pheasant, red-legged partridge, and guinea fowl assays) or 18SEU-FW/18SEU-REV primers (pigeon, Eurasian woodcock, and song thrush assays). In all electrophoretic images, lanes 1 to 6 are samples of binary mixtures containing 0.1, 1, 5, 10, 25, and 50% of the target species, respectively. M = molecular weight marker 50- to 1,000-bp ladder (Biomarker Low, BioVentures Inc., Murfreesboro, TN); C- = negative control.



**Figure 5.** Electrophoretic analysis of the PCR products obtained from binary mixtures of sterilized muscle from (a) quail in chicken, (b) pheasant in chicken, (c) red-legged partridge in chicken, (d) guinea fowl in chicken, (e) woodpigeon in chicken, (f) Eurasian woodcock in chicken, and (g) song thrush in chicken using COTDLOOP-FW/COTDLOOP-REV, PHADLOOP-FW/PHADLOOP-REV, ALECDLOOP-FW/ALECDLOOP-REV, NUMDLOOP-FW/NUMDLOOP-REV, COLDLOOP-FW/COLDLOOP-REV, SCODLOOP-FW/SCODLOOP-REV, and TURDLOOP-FW/TURDLOOP-REV primers, respectively, combined with 18SpEUDIR/18SpEUINV primers (quail, pheasant, red-legged partridge, and guinea fowl assays) or 18SEU-FW/18SEU-REV primers (woodpigeon, Eurasian woodcock, and song thrush assays). In all electrophoretic images, lanes 1 to 6 are samples of binary mixtures containing 0.1, 1, 5, 10, 25, and 50% of the target species, respectively. M = molecular weight marker 50- to 1,000-bp ladder (Biomarker Low, BioVentures Inc., Murfreesboro, TN); C- = negative control.

**Table 3.** Results for the PCR analysis of commercial meat products from quail (COTDLOOP-FW/COTDLOOP-REV), pheasant (PHADLOOP-FW/PHADLOOP-REV), partridge (ALECDLOOP-FW/ALECDLOOP-REV), guinea fowl (NUMDLOOP-FW/NUMDLOOP-REV), pigeon (COLDLOOP-FW/COLDLOOP-REV), Eurasian woodcock (SCODLOOP-FW/SCODLOOP-REV), and song thrush (TURDLOOP-FW/TURDLOOP-REV)

Animal species on the label	Type of product	COTDLOOP-FW/REV	PHADLOOP-FW/REV	ALECDLOOP-FW/REV	NUMDLOOP-FW/REV	COLDLOOP-FW/REV	SCODLOOP-FW/REV	TURDLOOP-FW/REV	18SpEUDIR/18SpEUNV or 18SEU-FW/18SEU-REV <sup>1</sup>
Quail	Braised meat	96 bp	— <sup>2</sup>	—	—	—	—	—	+ <sup>3</sup>
Quail	Pickled meat	96 bp	—	—	—	—	—	—	+
Quail	Boned meat	96 bp	—	—	—	—	—	—	+
Quail	Minced meat	96 bp	—	—	—	—	—	—	+
Quail	Pâté A	96 bp	—	—	—	—	—	—	+
Quail	Pâté B	96 bp	—	—	—	—	—	—	+
Quail	Braised meat	—	100 bp	—	—	—	—	—	+
Pheasant	Ragout	—	100 bp	—	—	—	—	—	+
Pheasant	Pâté A	—	100 bp	—	—	—	—	—	+
Pheasant	Pâté B	—	100 bp	—	—	—	—	—	+
Pheasant	Pâté C	—	100 bp	—	—	—	—	—	+
Pheasant	Pâté D	—	100 bp	—	—	—	—	—	+
Pheasant	Pâté E	—	100 bp	—	—	—	—	—	+
Partridge	Braised meat	—	—	106 bp	—	—	—	—	+
Partridge	Pickled meat	—	—	106 bp	—	—	—	—	+
Partridge	Boned meat	—	—	106 bp	—	—	—	—	+
Partridge	Pâté A	—	—	106 bp	—	—	—	—	+
Partridge	Pâté B	—	—	—	—	—	—	—	+
Partridge	Pâté C	—	—	—	—	—	—	—	+
Partridge	Pâté D	—	—	—	—	—	—	—	+
Partridge	Pâté E	—	—	106 bp	—	—	—	—	+
Guinea fowl	Braised meat A	—	—	—	104 bp	—	—	—	+
Guinea fowl	Braised meat B	—	—	—	104 bp	—	—	—	+
Guinea fowl	Minced meat A	—	—	—	104 bp	—	—	—	+
Guinea fowl	Minced meat B	—	—	—	104 bp	—	—	—	+
Guinea fowl	Pâté A	—	—	—	104 bp	—	—	—	+
Pigeon	Braised meat	—	—	—	—	147 bp	—	—	+
Pigeon	Pickled meat A	—	—	—	—	147 bp	—	—	+
Pigeon	Pickled meat B	—	—	—	—	147 bp	—	—	+
Pigeon	Pâté A	—	—	—	—	147 bp	—	—	+
Pigeon	Pâté B	—	—	—	—	147 bp	—	—	+
Pigeon	Pâté C	—	—	—	—	147 bp	—	—	+
Eurasian woodcock	Refrigerated meat A	—	—	—	—	—	127 bp	—	+
Eurasian woodcock	Refrigerated meat B	—	—	—	—	—	127 bp	—	+
Eurasian woodcock	Frozen meat	—	—	—	—	—	127 bp	—	+
Song thrush	Refrigerated meat A	—	—	—	—	—	—	154 bp	+
Song thrush	Refrigerated meat B	—	—	—	—	—	—	154 bp	+

<sup>1</sup>Primers 18SpEUDIR/18SpEUNV and 18SEU-FW/18SEU-REV were used as positive control of the assay depending on the sizes of the species-specific amplicons.

<sup>2</sup>Means no amplification of the PCR product.

<sup>3</sup>Means amplification with the positive control primers.

## IDENTIFICATION OF GAME BIRD MEAT

1031

ers successfully amplified conserved fragments of 141 or 89 bp, respectively, on the 18S rRNA gene of all game and domestic species analyzed avoiding any possible false-negative amplification throughout the assays due to PCR inhibition.

It has been widely reported that identification of animal species by PCR analysis can be difficult in samples of complex composition, which have been subjected to intensive processing. Although DNA exhibits fairly high thermal stability, intense heat coupled with high pressure conditions may cause severe DNA degradation leading to difficulties in obtaining reliable results in PCR amplification, especially when the fragments to be amplified are too large (Arslan et al., 2006; Corona et al., 2007). Consequently, species identification in samples in which DNA is liable to be degraded must rely on amplification of short DNA targets (Krcmar and Rencova, 2005).

To check the influence of processing treatments on the suitability of the PCR method developed, DNA extracted from experimentally pasteurized (72°C for 30 min) and sterilized (121°C for 20 min) quail, pheasant, partridge, guinea fowl, pigeon, Eurasian woodcock, and song thrush meats was assayed under the amplification conditions described in this work. Polymerase chain reaction results indicated effective amplification of the desired DNA segments in all heat-treated samples, confirming the ability of the PCR to amplify relatively short segments in highly damaged DNA (Figure 3).

To determine the detection limit of the assay for the species analyzed, PCR amplification was performed on muscle binary mixtures containing 0.1, 1, 5, 10, 25, and 50% (wt/wt) of each target species in chicken muscle. To confirm the absence of PCR inhibition, duplex PCR was carried out combining each species-specific primer pair with 18SpEUDIR/18SpEUINV or 18SEU-FW/18SEU-REV primers. For all species, it was observed that the lower the percentage of the target meat in the admixture, the fainter the band obtained in the PCR with the corresponding specific primers (Figures 4 and 5). The detection limit (lowest percentage producing visible DNA amplifications) of the assay was set on 0.1% for the 7 species-specific primers, either on raw (Figure 4) or sterilized binary mixtures (Figure 5).

Although many reports have focused their interest on the development of sensitive and versatile PCR methodologies, the information gained has mainly been based on studies performed with experimental mixtures of raw or heat-treated meat samples rather than commercial meat products, in which different types of processing and ingredients may be combined (Pascoal et al., 2004). In this work, several raw and heat-treated commercial meat products from quail, pheasant, partridge, guinea fowl, pigeon, Eurasian woodcock, and song thrush were also analyzed to evaluate the usefulness of the PCR method developed. As can be seen in Table 3, in most cases, the results obtained from the analysis of meat products were in agreement with the declaration of quail, pheasant, partridge, guinea fowl,

pigeon, Eurasian woodcock, or song thrush content on the label. However, 2 partridge pâtés, which were supposed to contain partridge, were not amplified with the partridge-specific primers. Nevertheless, successful amplification was obtained with the positive control primers, suggesting a possible fraud in the labeling of these 2 pâté samples (Table 3). The results obtained indicate that the PCR approach developed in this work seems to be an accurate method to achieve species identification in complex meat products produced by a variety of different technological processes.

Compared with alternative techniques for species identification such as direct sequencing of PCR products, or PCR-RFLP, PCR using specific primers offers the advantage of being cheaper, faster, and more useful for routine analysis of large numbers of samples. Moreover, it can be applied to the analysis of admixed meats (pâtés and minced meat products) including 2 or more species in their composition for which direct sequencing or PCR-RFLP may be restricted because results obtained after sequencing or digestion of the PCR products might show a combination of miscellaneous sequences or restriction patterns representing all of the possible species included in the admixed sample (Girish et al., 2004).

It can be concluded that the PCR method described in this paper is simple, specific, and sensitive, allowing the specific identification of quail, pheasant, partridge, guinea fowl, pigeon, Eurasian woodcock, and song thrush even in samples subjected to severe heat-pressure treatment. This PCR assay may therefore be appropriate for meat inspectors, regulatory agencies, and food control laboratories to detect fraudulent manipulations and to enforce accurate labeling of game bird meat products.

## ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by grant no. AGL 2007-60077 from the Ministerio de Educación y Ciencia of Spain and the Programa de Vigilancia Sanitaria S-0505/AGR/000265 from the Comunidad de Madrid (Spain). María Rojas and Miguel Ángel Pavón are recipients of a fellowship from the Ministerio de Educación y Ciencia (Spain). Nicolette Pegels is the recipient of a fellowship from the Comunidad de Madrid (Spain). We are indebted to Santiago Lavin González (Facultad de Veterinaria, Universidad Autónoma de Barcelona, Spain), Juan José Negro Balmaseda (Estación Biológica de Doñana, Sevilla, Spain), and Susana Dunner (Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense, Madrid, Spain) for kindly supplying capercaillie, red-legged partridge, and barbara partridge samples.

## REFERENCES

- Arslan, A., O. I. Ilhak, and M. Calicioglu. 2006. Effect of method of cooking on identification of heat processed beef using polymerase chain reaction (PCR) technique. *Meat Sci.* 72:326–330.



- Che Man, Y. B., A. A. Aida, A. R. Raha, and R. Son. 2007. Identification of pork derivatives in food products by species-specific polymerase chain reaction (PCR) for halal verification. *Food Contr.* 18:885–889.
- Chisholm, J., A. Sánchez, J. Brown, and H. Hird. 2008. The development of species-specific real-time PCR assays for the detection of pheasant and quail in food. *Food Anal. Methods* 1:190–194.
- Corona, B., R. Leonard, Y. Carpio, O. Uffo, and S. Martínez. 2007. PCR detection of DNA of bovine, ovine-caprine and porcine origin in feed as part of a bovine spongiform encephalopathy control program. *Span. J. Agric. Res.* 5:312–317.
- Di Pinto, A., V. T. Forte, M. C. Conversano, and G. M. Tantillo. 2005. Duplex polymerase chain reaction for detection of pork meat in horse meat fresh sausages from Italian retail sources. *Food Contr.* 16:391–394.
- Fajardo, V., I. González, I. López-Calleja, I. Martín, M. Rojas, P. E. Hernández, T. García, and R. Martín. 2007a. Identification of meats from red deer (*Cervus elaphus*), fallow deer (*Dama dama*), and roe deer (*Capreolus capreolus*) using polymerase chain reaction targeting specific sequences from the mitochondrial 12S rRNA gene. *Meat Sci.* 76:234–240.
- Fajardo, V., I. González, I. López-Calleja, I. Martín, M. Rojas, P. E. Hernández, T. García, and R. Martín. 2007b. PCR identification of meats from chamois (*Rupicapra rupicapra*), Pyrenean ibex (*Capra pyrenaica*), and mouflon (*Ovis ammon*) targeting specific sequences from the mitochondrial D-loop region. *Meat Sci.* 76:644–652.
- Fajardo, V., I. González, I. Martín, M. Rojas, P. E. Hernández, T. García, and R. Martín. 2007c. Differentiation of European wild boar (*Sus scrofa scrofa*) and domestic swine (*Sus scrofa domestica*) meats by PCR analysis targeting the mitochondrial D-loop and the nuclear melanocortin receptor 1 (MC1R) genes. *Meat Sci.* 78:314–322.
- Fujimura, T., T. Matsumoto, S. Tanabe, and F. Morimatsu. 2008. Specific discrimination of chicken DNA from other poultry DNA in processed foods using the polymerase chain reaction. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 72:909–913.
- Girish, P. S., A. S. R. Anjaneyulu, K. N. Viswas, M. Anand, N. Rajkumar, B. M. Shivakumar, and B. Sharma. 2004. Sequence analysis of mitochondrial 12S rRNA gene can identify meat species. *Meat Sci.* 66:551–556.
- Hird, H., J. Chisholm, and J. Brown. 2005. The detection of commercial duck species in food using a single probe-multiple species-specific primer real-time PCR assay. *Eur. Food Res. Technol.* 221:559–563.
- Kesmen, Z., F. Sahin, and H. Yetim. 2007. PCR assay for the identification of animal species in cooked sausages. *Meat Sci.* 77:649–653.
- Krcmar, P., and E. Rencova. 2005. Quantitative detection of species-specific DNA in feedstuffs and fish meals. *J. Food Prot.* 68:1217–1221.
- Martín, I., T. García, V. Fajardo, I. López-Calleja, M. Rojas, P. E. Hernández, I. González, and R. Martín. 2007. Mitochondrial markers for the detection of four duck species and the specific identification of Muscovy duck in meat mixtures using the polymerase chain reaction. *Meat Sci.* 76:721–729.
- Montiel-Sosa, J. F., E. Ruiz-Pesini, J. Montoya, P. Roncalés, M. J. López-Pérez, and A. Pérez-Martos. 2000. Direct and highly species-specific detection of pork meat and fat in meat products by PCR amplification of mitochondrial DNA. *J. Agric. Food Chem.* 48:2829–2832.
- Pascoal, A., M. Prado, J. Castro, A. Cepeda, and J. Barros-Velázquez. 2004. Survey of authenticity of meat species in food products subjected to different technological processes, by means of PCR-RFLP analysis. *Eur. Food Res. Technol.* 218:306–312.
- Peter, C., C. Brünen-Nieweler, K. Cammann, and T. Borchers. 2004. Differentiation of animal species in food by oligonucleotide microarray hybridization. *Eur. Food Res. Technol.* 219:286–293.
- Rodríguez, M. A., T. García, I. González, L. Asensio, P. E. Hernández, and R. Martín. 2004. Quantitation of mule duck in goose foie gras using TaqMan real-time polymerase chain reaction. *J. Agric. Food Chem.* 52:1478–1483.
- Rodríguez, M. A., T. García, I. González, L. Asensio, B. Mayoral, I. López-Calleja, P. E. Hernández, and R. Martín. 2003. Identification of goose, mule duck, chicken, turkey, and swine in foie gras by species-specific polymerase chain reaction. *J. Agric. Food Chem.* 51:1524–1529.
- Rojas, M., I. González, V. Fajardo, I. Martín, P. E. Hernández, T. García, and R. Martín. 2008. Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism authentication of raw meats from game birds. *J. AOAC Int.* 91:1416–1422.
- Rojas, M., I. González, V. Fajardo, I. Martín, P. E. Hernández, T. García, and R. Martín. 2009. Identification of raw and heat-processed meats from game bird species by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism of the mitochondrial D-loop region. *Poult. Sci.* 88:669–679.
- Sawyer, J., C. Wood, D. Shanahan, S. Gout, and D. McDowell. 2003. Real-time PCR for quantitative meat species testing. *Food Contr.* 14:579–583.
- Schlumpberger, T. 2004. DNA test identifies animal species in food products. *Food Technol.* 58:44–49.
- Sun, Y. L., and C. S. Lin. 2003. Establishment and application of a fluorescent polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) method for identifying porcine, caprine, and bovine meats. *J. Agric. Food Chem.* 51:1771–1776.
- Wang, S. 2009. Modern techniques for food authentication. *Trends Food Sci. Technol.* 20:107–108.
- Wolf, C., and J. Lüthy. 2001. Quantitative (QC) competitive PCR for quantification of porcine DNA. *Meat Sci.* 57:161–168.
- Zhang, C., M. R. Fowler, N. W. Scott, G. Lawson, and A. Slater. 2007. A TaqMan real-time PCR system for the identification and quantification of bovine DNA in meats, milks and cheeses. *Food Contr.* 18:1149–1158.

## Mitochondrial and nuclear markers for the authentication of partridge meat and the specific identification of red-legged partridge meat products by polymerase chain reaction

M. Rojas, I. González, M. Á. Pavón, N. Pegels, P. E. Hernández, T. García, and R. Martín<sup>1</sup>

*Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense, 28040 Madrid, Spain*

**ABSTRACT** Two PCR assays for the identification of partridge meat (red-legged partridge, chukar partridge, barbarry partridge, and gray partridge species) and the specific identification of red-legged partridge meat products were developed based on species-specific primers targeting the 12S ribosomal RNA mitochondrial gene. Moreover, various PCR techniques based on the use of random amplified polymorphic DNA markers and nuclear growth hormone and rhodopsin genes were tested to find a method for the differentiation between

pure and hybrid red-legged partridges. Among these techniques, the PCR method based on the amplification and sequencing of a nuclear rhodopsin gene fragment was selected as a suitable tool for the discrimination among meats from pure and hybrid red-legged partridge individuals. The PCR assays reported in this work could be useful in inspection programs to verify the correct labeling of raw and heat-treated partridge meat products.

**Key words:** 12S ribosomal ribonucleic acid gene, rhodopsin gene, polymerase chain reaction, partridge meat, red-legged partridge

2011 Poultry Science 90:211–222  
doi:10.3382/ps.2010-00895

### INTRODUCTION

To enforce control measures for the authentication of meat, the legislative authority of the European Union establishes that meat products sold for public consumption must be accurately labeled regarding species identification (Pascal and Mahé, 2001). However, the fraudulent mislabeling of meat is a widespread problem, particularly with high added-value meat species commanding a premium price. To detect such fraudulent products and protect consumers, the development of simple and rapid methods of analysis that facilitate routine control throughout the food chain is required (Verkaar et al., 2002).

A particular type of product susceptible to fraudulent labeling is partridge meat. Meat from the partridge is considered a delicacy and commands a high price compared with other meats because of its texture and flavor as well as its low fat and cholesterol content. Among the partridge species distributed in Spain for human consumption, the red-legged partridge (*Alectoris rufa*) is the most widespread native partridge species, and its

meat is greatly appreciated by consumers, constituting the base of a large number of regional gastronomic dishes (Martínez-Carrasco et al., 2005). Although the meat from this species traditionally originated from hunting activity, in the last decades severe changes in the Spanish countryside, continuous hunting, and adverse environmental conditions have contributed to a decrease in the wild red-legged partridge population (Tejedor et al., 2008). This fact, together with the growing demand for red-legged partridge meat, has resulted in an increase in the number of companies that breed the red-legged partridge in captivity for both meat production and restocking purposes. The other partridge species most frequently commercialized in Spain is the nonnative species *Alectoris chukar*. This species is raised on many farms for the production of meat and meat products. Moreover, because the chukar partridge offers easier management, a larger body size, and better practical prolificacy in captivity compared with the red-legged partridge, many red-legged partridge captive breeding farms use hybrid breeders that have been crossed with the chukar partridge to obtain more productive and docile animals for industrial production and management in captivity (Tejedor et al., 2007; Martínez-Fresno et al., 2008; Guerrini and Barbanera, 2009). It should be noted that although these hybrid partridges can be used for meat production, their use for restocking pur-

©2011 Poultry Science Association Inc.

Received May 13, 2010.

Accepted October 3, 2010.

<sup>1</sup>Corresponding author: rmartins@vet.ucm.es

poses is strictly forbidden by Spanish legislation (Law 4/1989 for the Conservation of Natural Landscapes and Wild Fauna and Flora; Government of Spain, 1989) because only pure red-legged partridges can be released in the Spanish countryside (Tejedor et al., 2006). Moreover, apart from the red-legged partridge and the chukar partridge, other partridge species that can be found in Spain are the gray partridge (*Perdix perdix*), which is distributed in the north of the Iberian Peninsula, and the barbary partridge (*Alectoris barbara*), which can be found in the Canary Islands, Ceuta, and Melilla (De Juana et al., 2000).

In recent years, the diversity of fresh or frozen cuts, processed meats, and ready-to-eat partridge meat products has increased significantly in the Spanish market. Among partridge meat products sold in the market, 3 different names can be found on the label, depending on the partridge species used for their preparation: "partridge," "red-legged partridge," and "game red-legged partridge." In the case of meat products labeled "partridge," any partridge species can be present, whereas in those products labeled red-legged partridge and game red-legged partridge, the species used must be the red-legged partridge. The difference between red-legged partridge and game red-legged partridge products comes from the fact that red-legged partridge products are prepared from farm-raised red-legged partridges, whereas those products labeled game red-legged partridge are prepared from red-legged partridges coming from hunting activity. Because the price of partridge products labeled red-legged partridge or game red-legged partridge is higher than the price of meat products labeled partridge, the red-legged partridge label could be indiscriminately used in products containing meat from other partridge species, resulting in large profits for manufacturers and suppliers. Considering this fact, the development of rapid and accurate methods for the identification of partridge meat is necessary not only to detect fraudulent practices involving the replacement of partridge meat for other less valuable species, but also to avoid fraudulent substitution of red-legged partridge with other partridge species.

Currently, a range of analytical methods have been developed to identify the animal origin of food products, mainly based on detecting either protein or DNA. In general terms, protein-based methods include electrophoretic, immunological, chromatographic, and mass-spectrometric techniques, most of which have proved to be effective and have been put into practice in certain instances (Yin et al., 2009). However, the presence and characteristics of proteins are tissue dependent, and meat processing may alter their structure and stability (Sáez et al., 2004). Therefore, the protein-based methods may fail in the analysis of heat-treated materials (Reale et al., 2008). By contrast, DNA analytical methods offer a promising alternative for reliable species differentiation, even in heated food samples, because the thermostability of DNA is much higher than that of

proteins. Most of the DNA-based methods currently being used rely on the simplicity and sensitivity of PCR (Peter et al., 2004). The PCR-based techniques most frequently used for meat species identification include the development of conserved DNA primers for PCR amplification, followed by complementary techniques such as sequencing or PCR-RFLP (Bellagamba et al., 2001; Girish et al., 2004; Prado et al., 2007; Rojas et al., 2008, 2009a). Alternatively, PCR using species-specific primers can be used for species identification without the need of further sequencing or digestion of the PCR products with restriction enzymes (Colombo et al., 2002; Kesmen et al., 2007; Martín et al., 2007; Rojas et al., 2009b).

Both nuclear and mitochondrial genes have been targeted for species identification by PCR. The use of mitochondrial DNA for species identification may offer a series of advantages. First, mitochondrial DNA genes are present in thousands of copies per cell. This fact should improve the possibility of amplifying template molecules of adequate size among the DNA fragments brought about by heat denaturation. In addition, mitochondrial DNA has a relatively high mutation rate as compared with nuclear DNA, which allows discrimination of even closely related species. Moreover, the vast knowledge of its organization, as well as the availability of reported sequences in many species, also makes an easy design of specific primers possible for the direct and specific identification of PCR-amplified fragments. (Montiel-Sosa et al., 2000; Girish et al., 2005; Che-Man et al., 2007). However, a drawback of mitochondrial DNA markers is that because the mitochondrial genome is inherited maternally, hybrid animals possess only the genetic signature of their maternal parent. Hence, when cross-breeding takes place between species, mitochondrial data for meat species identification should be supplemented with studies based on biparentally inherited nuclear genes (Arruga et al., 2007; Barbanera et al., 2007). Therefore, the major objective of this study was focused on the detection of partridge species and the specific identification of red-legged partridge in meat and meat products by PCR analysis using both mitochondrial and nuclear markers.

## MATERIALS AND METHODS

### **Selection of Meat Samples and DNA Extraction**

Authentic muscle samples of red-legged partridge (*Alectoris rufa*) were obtained from Antonio de Miguel (Madrid, Spain), Hermanos Sainz (Madrid, Spain), and the Estación Biológica de Doñana (Sevilla, Spain). Chukar partridge (*Alectoris chukar*) meat samples were provided by Hermanos Sainz. Barbary partridge (*Alectoris barbara*) meat samples were obtained from the Department of Animal Production (Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, Spain).

## IDENTIFICATION OF PARTRIDGE MEAT

213

Gray partridge meat samples were obtained from a breeder (León, Spain). These samples were used as reference partridge samples for the development of the assay. Meats from other game and domestic species were also acquired for analysis. Quail (*Coturnix coturnix*), pheasant (*Phasianus colchicus*), guinea fowl (*Numida meleagris*), ostrich (*Struthio camelus*), Eurasian woodcock (*Scolopax rusticola*), woodpigeon (*Columba palumbus*), and song thrush (*Turdus philomelos*) meat samples were provided by Antonio de Miguel. Chicken (*Gallus gallus*), turkey (*Meleagris gallopavo*), Muscovy duck (*Cairina moschata*), goose (*Anser anser*), cattle (*Bos taurus*), sheep (*Ovis aries*), goat (*Capra hircus*), and swine (*Sus scrofa domestica*) meat samples were obtained from several Spanish abattoirs and meat-cutting installations. All specimens were morphologically identified by professional veterinarians before obtaining the samples.

Fresh muscle portions from the selected specimens were processed immediately or stored frozen at  $-20^{\circ}\text{C}$  until use. Partridge meat samples were also analyzed after being subjected to experimental pasteurization ( $72^{\circ}\text{C}$  for 30 min) and sterilization ( $121^{\circ}\text{C}$  for 20 min) treatments.

Binary mixtures containing 0.1, 1, 5, 10, and 25% (wt/wt) of partridge meat in chicken meat were prepared with a blender (Sunbeam Oster, Delray Beach, FL) to a final weight of 100 g. Fifty grams of each mixture was sterilized at  $121^{\circ}\text{C}$  for 20 min. In addition, several commercial meat products, labeled partridge, red-legged partridge, and game red-legged partridge, purchased from different retail markets (Spain) were included in the analysis. Total DNA was extracted from meat as described in a previous work (Rojas et al., 2008). Deoxyribonucleic acid concentration was measured with a NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop Technologies Inc., Montchanin, DE).

### **Design of Species-Specific Primers Based in the Mitochondrial 12S Ribosomal RNA Gene and PCR Amplification of the Selected DNA Fragments from Partridge Meat**

The species-specific primers used for PCR amplification were designed based on the alignment and comparison of red-legged partridge (AM902517), chukar partridge (AM944504), barbary partridge (AM944502), quail (AM902516), pheasant (AM902515), guinea fowl (AM902518), woodpigeon (AM902521), Eurasian woodcock (AM902519), song thrush (AM902522), chicken (NC001323), turkey (U83741), Muscovy duck (AM902523), and goose (AY164530) 12S ribosomal RNA (rRNA) sequences obtained previously (Rojas et al., 2009b). In addition, the 12S-forward (FW) and 12S-reverse (REV) oligonucleotides, which were designed and reported by Fajardo et al. (2006), were used for the amplification, purification, and sequenc-

ing of an approximately 720-bp conserved fragment of the 12S rRNA gene from gray partridge according to the method of Rojas et al. (2008). The 12S rRNA gene sequence obtained from gray partridge (FN675565) was also included in the alignment.

Based on detailed analysis and comparison of the aligned 12S rRNA sequences, a partridge primer pair (12SALEC-FW/12SALEC-REV) was designed for the amplification of a common fragment of approximately 140 bp in the 12S rRNA gene of partridge species from the genus *Alectoris* (Rojas et al., 2009b). Moreover, another primer pair (12SPERDIX-FW/12SPERDIX-REV) was designed for the specific amplification of a 123-bp fragment in the 12S rRNA gene of gray partridge. A primer pair (12SARUFA-FW/12SARUFA-REV) was also designed for the specific amplification and identification of the red-legged partridge. This set of primers was expected to yield a specific fragment of 112 bp in the 12S rRNA gene of the red-legged partridge. Additionally, a conserved 89-bp fragment of the 18S rRNA gene flanked by the 18SEU-FW and 18SEU-REV primers (Rojas et al., 2009b) was used as a positive control for the assay. The EMBOSS software package version 2.0 and Primer Express 2.0 software (Perkin-Elmer/Applied Biosystems Division, Foster City, CA) were used for primer design.

Deoxyribonucleic acid amplifications were carried out in a final volume of 25  $\mu\text{L}$  containing 10 ng of template DNA, 2 mM  $\text{MgCl}_2$ , 200  $\mu\text{M}$  of each deoxynucleotide 5'-triphosphate, 10 pmol (for 12SALEC-FW/12SALEC-REV and 12SPERDIX-FW/12SPERDIX-REV) or 5 pmol (for 12SARUFA-FW/12SARUFA-REV) of each primer, and 1 U of *Tth* DNA polymerase (Biotools, Madrid, Spain) in a reaction buffer containing 75 mM Tris-HCl (pH 9.0), 50 mM KCl, 20 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , and 0.001% BSA. Forty amplification cycles were performed with the following step-cycle profile: strand denaturation at  $93^{\circ}\text{C}$  for 30 s, primer annealing at  $55^{\circ}\text{C}$  (for 12SALEC-FW/12SALEC-REV),  $60^{\circ}\text{C}$  (for 12SPERDIX-FW/12SPERDIX-REV), or  $65^{\circ}\text{C}$  (for 12SARUFA-FW/12SARUFA-REV) for 30 s, and primer extension at  $72^{\circ}\text{C}$  for 45 s. The last extension step was 5 min longer. An initial denaturation at  $93^{\circ}\text{C}$  for 2 min was carried out to improve the final result. Positive control amplifications were set using 5 pmol of 18SEU-FW/18SEU-REV primers combined in duplex PCR with each species-specific primer pair.

Polymerase chain reaction products (10  $\mu\text{L}$ ) were mixed with 2  $\mu\text{L}$  of gel loading solution (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), and loaded in a 3.5% MS8 (Hispanlab S.A., Torrejón, Spain) agarose gel containing 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of ethidium bromide in Tris-acetate buffer (0.04 M Tris-acetate and 0.001 M EDTA, pH 8.0). Electrophoretic separation was performed at 90 V for 60 min and the resulting DNA fragments were visualized by UV transillumination and analyzed using a Geldoc 1000 UV Fluorescent Gel Documentation System-PC (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA).

### **Amplification of Random Amplified Polymorphic DNA Markers from Red-Legged Partridge and Chukar Partridge Meats**

Amplifications for random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers were performed using the OP-C-08, OP-C-09, OP-C-20, and OP-H-12 primers according to the method of Barbanera et al. (2005). Deoxyribonucleic acid amplifications were carried out in a final volume of 25  $\mu$ L containing 10 ng of template DNA, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM of each deoxynucleotide 5'-triphosphate, 18.75 pmol of a single primer, and 0.6 U of *Tth* DNA polymerase (Biotools) in a reaction buffer containing 75 mM Tris-HCl (pH 9.0), 50 mM KCl, 20 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, and 0.001% BSA. Amplification was programmed as follows: 3 min at 94°C, 45 cycles of 30 s at 94°C, 30 s at 36°C, and 1 min at 72°C. The last extension step was 5 min longer. A 50% ramp was added between annealing and extension.

Polymerase chain reaction products (10  $\mu$ L) were mixed with 2  $\mu$ L of gel loading solution (Sigma-Aldrich), and loaded in a 1.4% D1 Low EEO (Hispanlab S.A.) agarose gel containing 1  $\mu$ g/mL of ethidium bromide in Tris-acetate buffer (0.04 M Tris-acetate and 0.001 M EDTA, pH 8.0). Electrophoretic separation was performed at 100 V for 75 min and the resulting DNA fragments were visualized by UV transillumination and analyzed using a Geldoc 1000 UV Fluorescent Gel Documentation System-PC (Bio-Rad Laboratories). Band pattern analysis was performed using Quantity One software (Bio-Rad Laboratories). Each specimen was tested 3 times for all the selected primers to check the reliability of single RAPD profiles.

### **Amplification and Sequence Analysis of Growth Hormone and Rhodopsin Gene Fragments from Red-Legged Partridge and Chukar Partridge Meats**

Growth hormone and rhodopsin gene analyses were performed according to the methods described by García and Arruga (2006) and Arruga et al. (2007). Red-legged partridge (AY606819, FJ593672) and chukar partridge (AY606820, FJ593673) growth hormone and rhodopsin gene sequences published in the GenBank/European Molecular Biology Laboratory databank (<http://www.ebi.ac.uk/embl/>) were respectively aligned using the EMMA program included in the EMBOSS software package version 2.0. After detailed examination of the sequence alignments, 2 primer sets were designed for the amplification of red-legged partridge and chukar partridge meats using the EMBOSS software package and Primer Express 2.0 software. These consisted of GH-FW/GH-REV and RHOD-FW/RHOD-REV oligonucleotides, which were expected to yield DNA fragments of 153 and 110 bp in the growth hormone and the rhodopsin gene, respectively, of all red-legged par-

tridge and chukar partridge individuals. The sequence and description of the primers used in this work are summarized in Table 1.

Polymerase chain reaction amplification was performed using 25  $\mu$ L containing 100 ng of template DNA, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 200  $\mu$ M of each deoxynucleotide 5'-triphosphate, 25 pmol of each primer, and 1 U of *Tth* DNA polymerase (Biotools) in a reaction buffer containing 75 mM Tris-HCl (pH 9.0), 50 mM KCl, 20 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, and 0.001% BSA. Amplifications were set with the following cycling conditions: an initial heat denaturation step at 94°C for 4 min 30 s, 40 cycles of amplification (94°C for 30 s, 50°C for 45 s, and 72°C for 1 min), and a final extension at 72°C for 5 min. Polymerase chain reaction products were analyzed by electrophoresis in a 3.5% MS8 (Hispanlab S.A.) agarose gel with ethidium bromide staining.

Nuclear growth hormone (153 bp) and rhodopsin amplicons (110 bp) obtained in several red-legged partridge and chukar partridge specimens as well as in commercial meat products from the target species were purified and sequenced as described previously (Rojas et al., 2008). The sequences obtained were submitted to the GenBank/European Molecular Biology Laboratory database and were assigned accession numbers FN675619-FN675640, FN811169-FN811176 (growth hormone gene sequences), and FN675760-FN675787, FN811177-FN811181, FN811344-FN811362 (rhodopsin gene sequences).

## **RESULTS AND DISCUSSION**

Over the past few decades, the progress in molecular techniques has allowed the identification of animal species of raw or processed meat products to protect consumers from fraud (Yin et al., 2009). Accordingly, various analytical methods based on DNA analysis have been developed in the field, mainly based on PCR amplification of mitochondrial or nuclear DNA (Fajardo et al., 2007; Sasazaki et al., 2007). In this work, a PCR method targeting specific sequences from the mitochondrial 12S rRNA gene was developed to detect the partridge species consumed in Spain (red-legged partridge, chukar partridge, barbary partridge, and gray partridge). In addition, because the price of red-legged partridge meat products is much higher than the price of meat from other partridge species, a PCR method targeting the mitochondrial 12S rRNA gene was also developed for specific identification of the red-legged partridge. Deoxyribonucleic acid analysis of nuclear markers was used to discriminate between pure and hybrid red-legged partridge individuals.

### **PCR Analysis of the Mitochondrial 12S rRNA Gene**

The mitochondrial 12S rRNA gene was selected in this work as a molecular marker for meat species identi-



## IDENTIFICATION OF PARTRIDGE MEAT

215

fication because it has a high number of copies per cell, an acceptable length, and a relatively high mutation rate, sufficient to allow discrimination of even closely related species. Moreover, the large number of sequences currently available in the databases facilitates the design of specific primers (Montiel-Sosa et al., 2000; Bellagamba et al., 2001; Zhang et al., 2007).

The detailed study of mitochondrial 12S rRNA sequences from the red-legged partridge, chukar partridge, barberry partridge, gray partridge, quail, pheasant, guinea fowl, Eurasian woodcock, woodpigeon, song thrush, chicken, turkey, Muscovy duck, and goose (Figure 1) allowed the design of a primer pair (12SALEC-FW/12SALEC-REV) that amplified a DNA fragment of approximately 140 bp in the partridge species from the genus *Alectoris* (Figure 2a). Taking into account that gray partridge species do not belong to the genus *Alectoris* but that its meat could be present in partridge meat products, a pair of primers (12SPERDIX-FW/12SPERDIX-REV) was design for the specific amplification of a 123-bp fragment from gray partridge DNA (Figure 2b). Additionally, a method for the specific identification of the red-legged partridge was developed to avoid mislabeling or fraudulent substitution of the most expensive red-legged partridge meat with meat from cheaper partridge species. In this context, as shown in Figure 1, the comparison of the mitochondrial 12S rRNA gene sequences for partridge species revealed that although the species were closely related, significant sequence heterogeneity existed between species. This allowed the design of a specific primer pair for detection of the red-legged partridge (12SARUFA-FW/12SARUFA-REV), which amplified a DNA fragment of 112 bp from red-legged partridge tissues, whereas no homologous product was amplified from any other partridge species tested (Figure 2c). Fifteen specimens from every meat species selected were analyzed in the PCR assays, yielding consistent and reproducible DNA amplification bands.

The specificity of the partridge primer pairs designed was tested using DNA obtained from muscle samples of 15 animal species (11 birds and 4 mammals), and no cross-species amplification was observed (results not shown). These results suggest an optimal specificity of the 3 primer pairs when tested for PCR amplification against a high number of game and domestic meat species distributed for human consumption. Demonstration of specificity against a large number of species is very important because when a reduced number of species are used to assess the specificity of the assay, a risk always exists of finding cross-reactivity with untested, closely related species, limiting the value of the assay for routine analysis (Martín et al., 2007). On the other hand, primers 18SEU-FW and 18SEU-REV successfully amplified a conserved 89-bp fragment on the 18S rRNA gene of all game and domestic species analyzed, demonstrating the success of DNA amplification resulting from the presence of inhibitory substances in the samples (results not shown).

Table 1. Deoxyribonucleic acid sequences of the primers used in this study

Primer	Length (bp)	Sequence (5' to 3')	Description	Source
12SALEC-FW	26	CGACCTAAACCACTCTTAGTTCCCA	<i>Alectoris</i> partridge forward primer	Rojas et al. (2009b)
12SALEC-REV	24	CGTAGTCTCGGGGGATATATG	<i>Alectoris</i> partridge reverse primer	Rojas et al. (2009b)
12SPERDIX-FW	24	TCAACTTAAACCCATCTTAGCCCA	Gray partridge forward primer	—
12SPERDIX-REV	21	TAGTTCAGGGGACACTCG	Gray partridge reverse primer	—
12SARUFA-FW	29	CACACTAACTAAGATCAAGCAAGCTAA	Red-legged partridge forward primer	—
12SARUFA-REV	23	CTGGCTTCGTGGTTTAAATTA	Red-legged partridge reverse primer	—
18SEU-FW	28	GCTCATTAATCAGTTATGGTTCCTTTG	Positive control forward primer	Rojas et al. (2009b)
18SEU-REV	26	CGTCGGCATGTATTAGCTCTAGAATT	Positive control reverse primer	Rojas et al. (2009b)
OP-C-08	10	TGGACCGGTG	RAPD <sup>2</sup> primer	Barbanera et al. (2005)
OP-C-09	10	CTCACCGTCC	RAPD primer	Barbanera et al. (2005)
OP-C-20	10	ACTTCGCCAC	RAPD primer	Barbanera et al. (2005)
OP-H-12	10	ACGCGCATGT	RAPD primer	Barbanera et al. (2005)
GROWTH-FW	20	GCACTGAGGGACGTGGTTTAT	Growth hormone gene forward primer	García and Arruga (2006)
GROWTH-REV	20	ACGAAATGTCAGACGGAG	Growth hormone gene reverse primer	García and Arruga (2006)
GH-FW	24	GTTTCACCTTGTGTATTGTAATGA	Growth hormone gene forward primer	—
GH-REV	24	CCTGGCTTTCTAGTTATTGAGTA	Growth hormone gene reverse primer	—
RHOD-FW	21	GCTCAGCTCCAGCCATACTG	Rhodopsin gene forward primer	—
RHOD-REV	17	CATGGCCCGCTCTGAG	Rhodopsin gene reverse primer	—

<sup>1</sup>Primers designed in the present work.

<sup>2</sup>RAPD = random amplified polymorphic DNA.

To check the influence of processing treatments on the suitability of the PCR method developed, DNA extracted from experimentally pasteurized (72°C for 30 min) and sterilized (121°C for 20 min) partridge meats

was assayed under the amplification conditions described in this work. Polymerase chain reaction results indicated effective amplification of the desired DNA segments in all heat-treated samples, confirming the

1	
<i>C. coturnix</i> (AM902516)	.....C.....G.....T.....C.....TT..
<i>P. colchicus</i> (AM902515)	.....G.....A.....CT..
<i>A. rufa</i> (AM902517)	.....T.....A.....C.....CACA
<i>A. chukar</i> (AM944504)	.....T.....C.....CG..
<i>A. barbara</i> (AM944502)	.....C.....TA..
<i>P. perdix</i> (FN675565)	.....T.G.....C.....T..-T..-C..TA..
<i>N. meleagris</i> (AM902518)	.....G.....AT.....CT.....AA..
<i>G. gallus</i> (NC001323)	.....T.....C.....TG..
<i>M. gallopavo</i> (U83741)	.....T.....T.....TAT..
<i>C. moschata</i> (AM902523)	.....GG.....CT.T..ACATA..G.....TA.TA.....CTAC
<i>A. anser</i> (AY164530)	.....CC.T..TATTG.CA.....TA..A..CC..CTAG
<i>S. rusticola</i> (AM902519)	.....G.....T..CT.TA.....A.G.....T..T..-C..-GT..
<i>C. palumbus</i> (AM902521)	.....C.....G..A.C..CT..C.T-T---CA.....A.T..-C..-G..
<i>T. philomelos</i> (AM902522)	.....G..GG.T.....T..CTTTAT---AA.....T.G.....-CA..
Consensus	GGTAAATCTCGTCCAGCCACCGCGTGCATACAAGAAACCAATCAATAGNCCNNNNNANCCGGCGTAAAGAGTGNCANCATGTTATCINNCA
12SARUFA-FW→	
<i>C. coturnix</i> (AM902516)	T.....G.....C.....G.....A.A.A.....CC.....CCA---T..TC..
<i>P. colchicus</i> (AM902515)	CC.C.....G..G.AC.....CT.....T....CA.....-C.....CTC---T....
<i>A. rufa</i> (AM902517)	CTAACTAAGATCAAAGCAAAGCTAA.....CT.....CCACCTAA---AAA-CCATCTTAGTTC-CCA.....TAATT
<i>A. chukar</i> (AM944504)	T.....C.A.....G.....CT.....CGACCTAA---AAA-CCATCTTAGTTC-CCA.....
<i>A. barbara</i> (AM944502)	C.....GC.AG.....G.....CT.....CCACCTAA---AA-CCATCTTAGTTCCTCA.....C..
<i>P. perdix</i> (FN675565)	ACC.....G.....C.....CT..T.....T..A.T.T---C-CC.....CCC-A..T..TT..
<i>N. meleagris</i> (AM902518)	CC.....T.....T.....T.....A.....ACCTCA---AAA-CAATCTTAGCCA-CCA.....C..
<i>G. gallus</i> (NC001323)	CC.G.....T.....C.....T.....A..CA.....T-CC.....CCT-CA.....TT..
<i>M. gallopavo</i> (U83741)	CC..T.....G..T.....T.....G.....A.....ATG.....ACTT-A..TC..
<i>C. moschata</i> (AM902523)	T.....CGG.....GC.....A.....CG.....A.A..C.A.C---G..TG.....AAACTAG.....GG..
<i>A. anser</i> (AY164530)	C.....C.....G.....G.....A.A..C.A.T---G..TG.....GAACTA.....TG..
<i>S. rusticola</i> (AM902519)	A..T.....C..GG..C.....T.....G..TAC.....T.TC.T.G.CTA..ATG.....TAT--GA..TAT..
<i>C. palumbus</i> (AM902521)	T...T.....G.....C.C.G..G.....TT..G.G..T..AA..GC.....A.TACG.C.C..AACTCAT.....TC.A..
<i>T. philomelos</i> (AM902522)	G..G.....T.....A.C..G.....G.C.A.....G..TC.G.CTTCA..GAAG.....AA-CA.....TT..
Consensus	NTAACTAAGATCAAAATGNAACCTAAGCTGTGCATAAGCCCAAGATNCACCTAAGCCCANCTNANNNAANNNATCTTAGNNNNNACGACNAATT
←12SARUFA-REV	
<i>C. coturnix</i> (AM902516)	.C..T.....G.....A.....A.....CAC---A..TT.T.....
<i>P. colchicus</i> (AM902515)	.T.C.....A.....A..G..TAC---A..C.T.C.....
<i>A. rufa</i> (AM902517)	TAAACCCACGAAAGCCAG.....T.....CCCCATT...CAATATATCCGCC
<i>A. chukar</i> (AM944504)	.....A.....T.....T.CCA---T...CAATATATCCGCC
<i>A. barbara</i> (AM944502)	.C.....A.ACA---TTC..TAATATATCCGCC
<i>P. perdix</i> (FN675565)	.C.....A.....A..C..CGC---AC...CGA..G.....
<i>N. meleagris</i> (AM902518)	.C.....G.....A.....A.....TTCA---A..T.A.....
<i>G. gallus</i> (NC001323)	.T.....T.....A.C.....A.....TCCC--ATC..AC.T.....
<i>M. gallopavo</i> (U83741)	.G.....G.....TAAT---A..TC.C.....
<i>C. moschata</i> (AM902523)	.....G.C.....TTATC--C..G.A.....
<i>A. anser</i> (AY164530)	.....G.C.....TTACT--T..G.A.....
<i>S. rusticola</i> (AM902519)	..TT.....T..A.T.....A..A.....GT.TTCC-ATA..T.GAC.....
<i>C. palumbus</i> (AM902521)	G..CT.....GT.....G.TCTAT--ATA..A.A.C.....
<i>T. philomelos</i> (AM902522)	G..G.....A.C.....G..TCGAT--AT..TGA.C.....
Consensus	TAAACCCACGAAAGCCAGGNCACAACTGCGATTAGATACCCACTATGCTGCCCTAAATCTTGATACNNNNNNNNNATACNANGTATCCGCC
←12SALEC-REV	
<i>C. coturnix</i> (AM902516)	T.....C.....
<i>P. colchicus</i> (AM902515)	C.....
<i>A. rufa</i> (AM902517)	CGAGAACTACG.....
<i>A. chukar</i> (AM944504)	CGAGAACTACG.....
<i>A. barbara</i> (AM944502)	CGAGAACTACG.....
<i>P. perdix</i> (FN675565)	T.....T.....G..C.....
<i>N. meleagris</i> (AM902518)	T.....C.....
<i>G. gallus</i> (NC001323)	T.....A.....
<i>M. gallopavo</i> (U83741)	T.....G.....
<i>C. moschata</i> (AM902523)	A.....T.....G.....C.....
<i>A. anser</i> (AY164530)	A.....C.....C.....
<i>S. rusticola</i> (AM902519)	A.....C.....T.....
<i>C. palumbus</i> (AM902521)	T.....G.....C.....
<i>T. philomelos</i> (AM902522)	C.....G.....G.....
Consensus	NGAGAACTACGAGCACAAACGCTTAAAACTCTAAGGACTTGGCGGTGCCCAAACCCACCTAGAGGAGCTGTCTATAATCGATAATCCACGAT

**Figure 1.** Deoxyribonucleic acid sequence alignment of the 12S ribosomal RNA gene PCR products from quail (*Coturnix coturnix*; AM902516), pheasant (*Phasianus colchicus*; AM902515), red-legged partridge (*Alectoris rufa*; AM902517), chukar partridge (*Alectoris chukar*; AM944504), barbara partridge (*Alectoris barbara*; AM944502), gray partridge (*Perdix perdix*; FN675565), guinea fowl (*Numida meleagris*; AM902518), chicken (*Gallus gallus*; NC001323), turkey (*Meleagris gallopavo*; U83741), Muscovy duck (*Cairina moschata*; AM902523), goose (*Anser anser*; AY164530), Eurasian woodcock (*Scolopax rusticola*; AM902519), woodpigeon (*Columba palumbus*; AM902521), and song thrush (*Turdus philomelos*; AM902522). Primers 12SALEC-FW/12SALEC-REV, 12SPERDIX-FW/12SPERDIX-REV, and 12SARUFA-FW/12SARUFA-REV are underlined and shaded.

## IDENTIFICATION OF PARTRIDGE MEAT

217

ability of PCR to amplify relatively short segments in highly damaged DNA (results not shown).

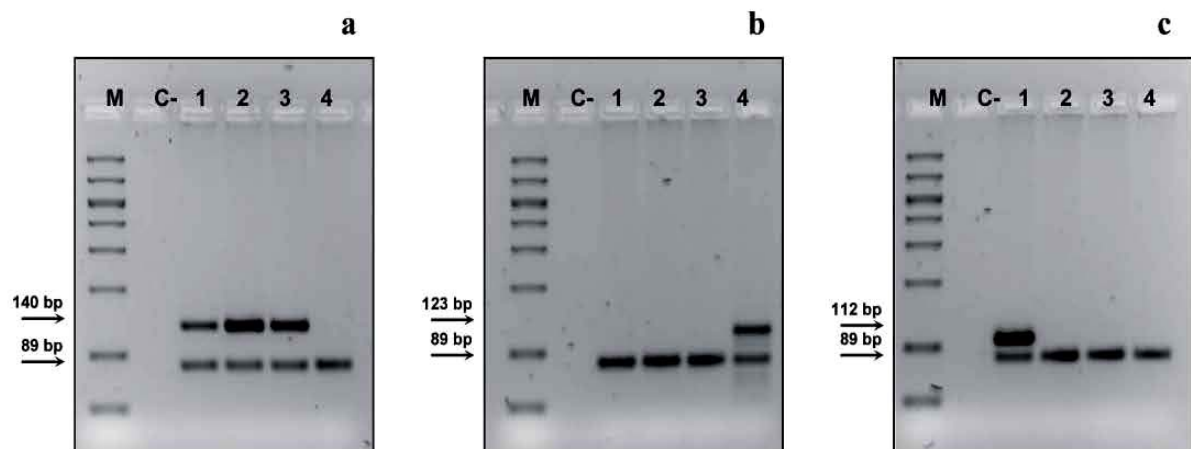
To determine the sensitivity of the assay for detection of the species analyzed, PCR amplification was performed on muscle binary mixtures containing 0.1, 1, 5, 10, and 25% (wt/wt) of each target species in chicken muscle. Duplex PCR was carried out by combining each species-specific primer pair with primers 18SEU-FW/18SEU-REV to confirm the absence of PCR inhibition. The lowest percentage tested that produced visible DNA amplifications was 0.1% for the 3 species-specific primers on either raw or sterilized binary mixtures. Figure 3 shows the results obtained from the analysis of raw (Figure 3a) and sterilized (Figure 3b) binary meat mixtures from red-legged partridge by using the specific primers 12SARUFA-FW/12SARUFA-REV combined with the primers 18SEU-FW/18SEU-REV. Similar results were obtained in the analysis of raw and sterilized binary mixtures from the red-legged partridge, chukar partridge, and barbery partridge with primers 12SALEC-FW/12SALEC-REV, and from the analysis of gray partridge binary mixtures with primers 12SPERDIX-FW/12SPERDIX-REV (results not shown).

The method was also tested with regard to its suitability for detecting partridge DNA in commercial meat products. For that purpose, DNA samples extracted from several raw and heat-treated partridge meat products were analyzed. As shown in Table 2, in most cases the results obtained from the analysis of partridge meat products were in agreement with the declaration of partridge content on the label. However, 8 partridge pâtés, which supposedly contained partridge, were not amplified with any of the partridge-specific primers. Nevertheless, successful amplification was obtained with the positive control primers, suggesting possible fraud in the labeling of these pâté samples (Table 2). It should

be noted that no partridge meat product was amplified with primers 12SPERDIX-FW/12SPERDIX-REV, which revealed the gray partridge species were not used for the preparation of partridge meat products. The results obtained indicate that the PCR assay using *Alectoris* and gray partridge primers allowed the detection of all the partridge species consumed in Spain with high specificity and sensitivity.

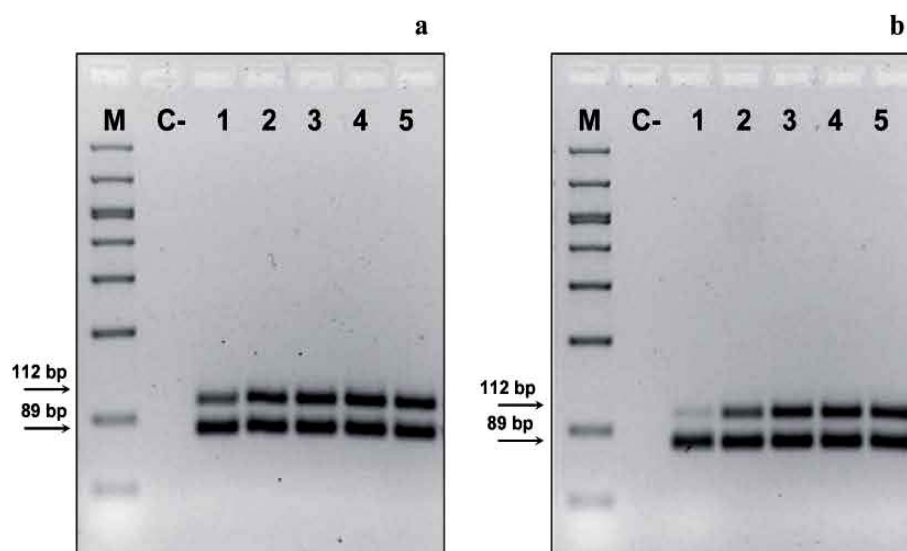
Concerning the specific identification of red-legged partridge meat, several partridge meat products were amplified with primers 12SARUFA-FW/12SARUFA-REV, which indicated the presence of red-legged partridge in their composition (Table 2). Nevertheless, 5 partridge products that were labeled red-legged partridge were not amplified with red-legged partridge species-specific primers. These results would indicate possible fraud in the labeling of these products. However, it should be remembered that, as explained previously, red-legged partridges are often crossed with chukar partridges in meat production farms to increase the productivity of the animals. Given this fact, both pure red-legged partridges and hybrids resulting from crosses between red-legged and chukar partridges could be present in products labeled red-legged partridge. Considering this aspect, the use of red-legged partridge species-specific primers based on the 12S rRNA mitochondrial gene presents some limitations for the detection of fraudulent labeling of red-legged partridge products. This is ascribed to the fact that because mitochondrial DNA is inherited maternally, red-legged partridge-specific primers will detect only those partridge individuals with red-legged partridge maternal lineage. Therefore, if chukar females are crossed with red-legged males, the resulting hybrid partridges will not be amplified by the specific red-legged partridge primers.

On the other hand, all red-legged partridge meat products specifically labeled game red-legged par-



**Figure 2.** Electrophoretic analysis of the 12S ribosomal RNA gene amplification products obtained using (a) 12SALEC-FW/12SALEC-REV, (b) 12SPERDIX-FW/12SPERDIX-REV, and (c) 12SARUFA-FW/12SARUFA-REV species-specific primers combined with 18SEU-FW/18SEU-REV primers. Samples correspond to red-legged partridge (lane 1), chukar partridge (lane 2), barbery partridge (lane 3), and gray partridge (lane 4) raw meats. M = molecular weight marker, 50- to 1000-bp ladder (Biomarker Low, BioVentures Inc., Murfreesboro, TN); C- = negative control.





**Figure 3.** Electrophoretic analysis of the PCR products obtained from binary mixtures of raw (a) and sterilized (b) muscle from the red-legged partridge in chicken, using the 12SARUFA-FW/12SARUFA-REV primers combined with the 18SEU-FW/18SEU-REV primers. In both electrophoretic images, lanes 1 to 5 are samples of binary mixtures containing 0.1, 1, 5, 10, and 25% of red-legged partridge, respectively. M = molecular weight marker, 50- to 1000-bp ladder (Biomarker Low, BioVentures Inc., Murfreesboro, TN); C- = negative control.

tridge were successfully amplified with the 12SARUFA-FW/12SARUFA-REV primers. However, the use of these primers also presents limitations for the detec-

tion of fraudulent labeling in these types of products because it does not allow for determination of whether the amplified DNA fragments correspond to pure red-

**Table 2.** Results for the PCR analysis of commercial meat products from the partridge using primers 12SALEC-FW/12SALEC-REV, 12SPERDIX-FW/12SPERDIX-REV, and 12SARUFA-FW/12SARUFA-REV

Animal species on the label	Type of product	12SALEC-FW/ 12SALEC-REV (bp)	12SPERDIX-FW/ 12SPERDIX-REV (bp)	12SARUFA-FW/ 12SARUFA-REV (bp)	18SEU-FW/ 18SEU-REV <sup>1</sup> (bp)
Red-legged partridge	Fresh meat A, B	~140	—	112	89
Red-legged partridge	Fresh meat C	~140	—	—	89
Red-legged partridge	Fresh meat D to O	~140	—	112	89
Partridge	Fresh meat A to O	~140	—	—	89
Partridge	Braised meat A	~140	—	—	89
Red-legged partridge	Braised meat B	~140	—	—	89
Partridge	Braised meat C	~140	—	—	89
Partridge	Pickled meat A	~140	—	—	89
Red-legged partridge	Pickled meat B, C	~140	—	112	89
Partridge	Pickled meat D, E	~140	—	—	89
Red-legged partridge	Pickled meat F	~140	—	112	89
Game red-legged partridge	Pickled meat G	~140	—	112	89
Red-legged partridge	Pickled meat H	~140	—	—	89
Red-legged partridge	Meat in sauce A, B	~140	—	—	89
Red-legged partridge	Meat in sauce B	~140	—	—	89
Partridge	Pickled thighs A, B	~140	—	112	89
Partridge	Boned pickled meat A to C	~140	—	—	89
Game red-legged partridge	Boned pickled meat D, E	~140	—	112	89
Partridge	Pâté A	—	—	—	89
Partridge	Pâté B	~140	—	112	89
Red-legged partridge	Pâté C	~140	—	112	89
Partridge	Pâté D	~140	—	112	89
Partridge	Pâté E, F	~140	—	—	89
Partridge	Pâté G	~140	—	112	89
Partridge	Pâté H, I	—	—	—	89
Partridge	Pâté J, K	~140	—	112	89
Partridge	Pâté L, M	—	—	—	89
Partridge	Pâté N	~140	—	—	89
Partridge	Pâté O to Q	—	—	—	89
Partridge	Pâté R to U	~140	—	—	89

<sup>1</sup>Primers 18SEU-FW/18SEU-REV were used as the positive control for the assay. A dash means there was no amplification of the PCR product.

## IDENTIFICATION OF PARTRIDGE MEAT

219

legged partridges coming from hunting activity or to farm hybrid individuals resulting from crosses between red-legged females and chukar males.

Consequently, because the use of red-legged partridge-specific primers targeting the 12S rRNA mitochondrial gene can provide misleading results in situations in which hybridization exists between red-legged partridge and chukar partridge species, other techniques, based on the analysis of genetic markers capable of identifying hybrid individuals, are needed to detect fraudulent labeling of red-legged partridge meat products.

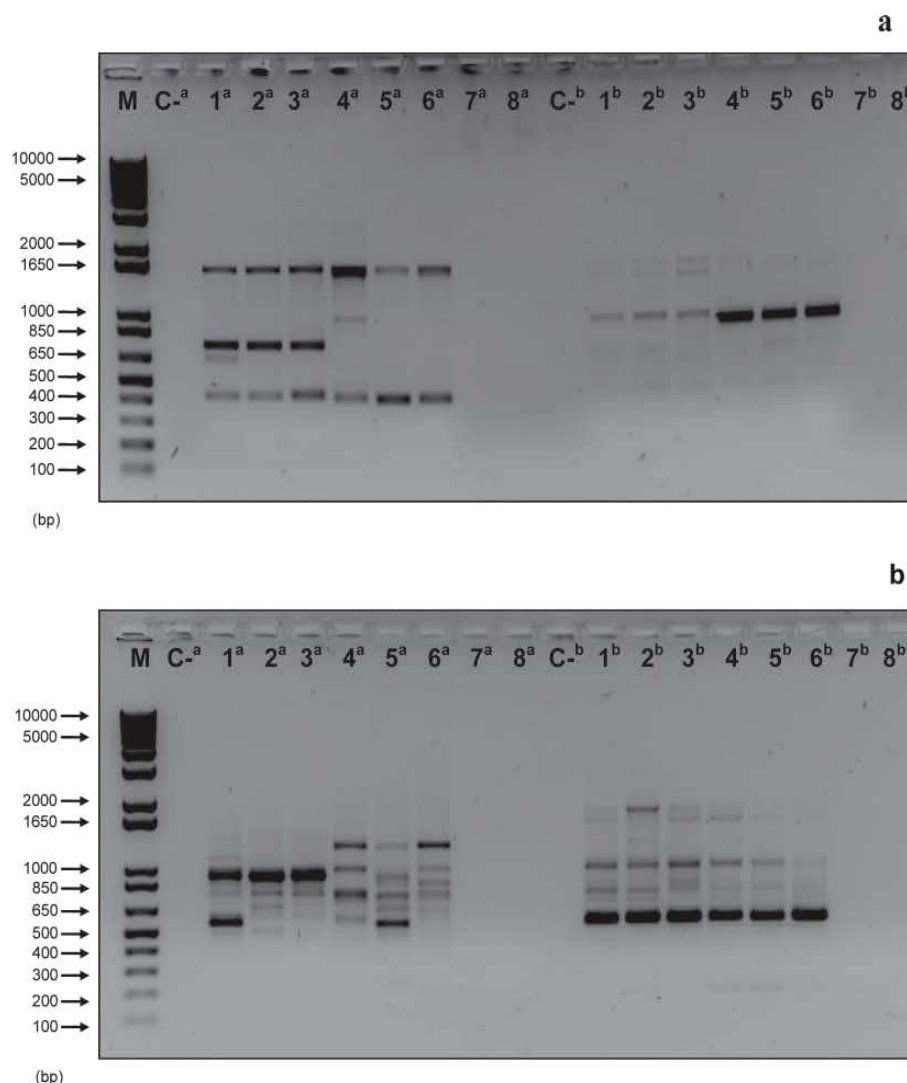
### **PCR Analysis of RAPD Markers and Nuclear Growth Hormone and Rhodopsin Genes**

To find a reliable method for detecting fraudulent labeling of red-legged partridge meat products, we carried out a search and review of the genetic markers already used to differentiate pure red-legged partridges from hybrids resulting from crosses between the red-legged partridge and chukar partridge. After detailed study of the existing methods, the PCR techniques developed by Barbanera et al. (2005), García and Arruga (2006), and Arruga et al. (2007) for the analysis of genetic variability in partridge populations were selected. Barbanera et al. (2005) carried out a differentiation of red-legged partridge, chukar partridge, and their hybrids by means of RAPD analysis using OP-C-08, OP-C-09, OP-C-20, and OP-H-12 primers. The results obtained from the analysis of some red-legged and chukar partridge meats using these primers are shown in Figure 4. As can be seen, the OP-C-08 primer yielded a species-specific band from raw red-legged partridge meat of approximately 750 bp, whereas a chukar partridge-specific band of approximately 1,300 bp was obtained with the OP-C-20 primer. However, no bands were obtained from heat-treated meat products, thus preventing the application of the RAPD technique for the analysis of this type of processed meats.

As an alternative to RAPD markers, PCR techniques based on the detection of SNP have also been used to differentiate the red-legged partridge, chukar partridge, and their hybrids (García and Arruga, 2006; Arruga et al., 2007). In the method developed by García and Arruga (2006), sequencing of a 290-bp growth hormone gene fragment revealed the presence of 2 interspecific SNP between the red-legged partridge and chukar partridge. These consisted of a change of cytosine (C) for thymine (T) at position 109, and a change of guanine (G) for adenine (A) at position 204. Taking into account that nuclear genes are biparentally inherited, it can be predicted that hybrid partridge individuals resulting from crosses between the red-legged partridge and chukar partridge will present the sequence dimorphisms C/T and G/A in the diagnostic positions. To check the applicability of this method, red-legged and chukar partridge meat samples as well as partridge commercial meat products were analyzed using the

growth hormone primers GROWTH-FW/GROWTH-REV designed by García and Arruga (2006). Although these primers yielded the 290-bp growth hormone gene fragment from raw meat samples, no amplification was obtained from samples with highly degraded DNA, such as braised, pickled, and sterilized meats (results not shown). Taking this fact into account, we designed another primer pair for the amplification of a shorter DNA fragment containing the diagnostic SNP. The primers GH-FW/GH-REV were designed to amplify a 153-bp fragment from all red-legged partridge and chukar partridge individuals analyzed in this work (results not shown). The growth hormone amplicons obtained were purified and sequenced as described previously (Rojas et al., 2008). Detailed examination of the growth hormone sequence chromatographs obtained revealed that most of the reference red-legged and chukar partridges (FN675619-FN675624, FN675626-FN675634, FN675636-FN675640, FN811170-FN811174) presented the SNP described by García and Arruga (2006). However, some red-legged and chukar partridge individuals (FN675625, FN675635, FN811169, FN811175, FN811176) presented the sequence dimorphisms C/T or G/A in only one of the diagnostic positions. These results could be ascribed to the occurrence of intraspecific mutations in the diagnostic positions, which would affect the applicability of these SNP for the detection of hybrids.

Arruga et al. (2007) also reported the presence of an SNP between red-legged partridge and chukar partridge species in a 441-bp fragment from intron 1 of the rhodopsin gene consisting of a T for C base change at position 87. Based on this study, and to adapt the PCR methodology described by these authors for the analysis of heat-treated meat products, we designed a pair of primers for the amplification of a shorter fragment containing the diagnostic SNP. The designed primers (RHOD-FW/RHOD-REV) amplified a 110-bp fragment from the rhodopsin gene of all red-legged partridge and chukar partridge individuals analyzed in this work. Sequencing of the generated rhodopsin amplicons revealed that all the reference red-legged and chukar partridges (FN675770-FN675784, FN675760-FN675769, FN811177-FN811181) presented the diagnostic SNP at position 47. Given these results, the partridge commercial meat products analyzed in this work that were specifically labeled red-legged partridge and game red-legged partridge were also amplified and sequenced with the rhodopsin primers. As shown in Table 3, all the samples amplified with red-legged partridge-specific primers presented the nucleotide T in the diagnostic position of the rhodopsin gene sequence, including the samples labeled game red-legged partridge. These results indicate correct labeling of these products because the presence of a unique T base in the diagnostic position is characteristic of pure red-legged partridges. In addition, 2 of the 5 samples labeled red-legged partridge that were not amplified with red-legged partridge-specific primers presented the dimor-



**Figure 4.** Random amplified polymorphic DNA banding profiles obtained using primers OP-C-08 (superscript a in panel a), OP-C-09 (superscript b in panel a), OP-C-20 (superscript a in panel b), and OP-H-12 (superscript b in panel b). In both electrophoretic images, samples correspond to red-legged partridge raw meats (lanes 1 to 3), chukar partridge raw meats (lanes 4 to 6), red-legged partridge braised meat (lane 7), and red-legged partridge pickled meat (lane 8). M = molecular weight marker, 1 kb plus DNA ladder (GibcoBRL, Grand Island, NY); C- = negative control.

phism T/C at the diagnostic position of the rhodopsin sequence. It can be deduced from these results that meat from hybrid partridges resulting from crosses between chukar females and red-legged males are present in these products. By contrast, only the C base characteristic of pure chukar partridges was found in the rhodopsin sequences of the other 3 samples labeled red-legged partridge, thus suggesting fraud in the labeling of these products. According to these results, PCR amplification with the RHOD-FW/RHOD-REV primers coupled with sequencing of the PCR products obtained could be used together with mitochondrial red-legged partridge-specific primers as a tool to detect fraudulent labeling of red-legged partridge meat products. However, it should be clarified that the PCR technique based

on the rhodopsin gene cannot be applied for the analysis of admixed meat products containing several species in their composition because the RHOD-FW/RHOD-REV primers are not species specific and they also amplify other species, such as quail. Given this fact, if quail or any other species amplified by these primers is present in the admixed sample, the chromatographs obtained after sequencing the generated PCR products will show a combination of sequences corresponding to all the amplified species, which would make interpretation of the results difficult.

The vast majority of PCR applications for partridge species identification published to date are based on the use of microsatellites, SNP, and RAPD markers for ecological studies of hybridization and genetic vari-

## IDENTIFICATION OF PARTRIDGE MEAT

221

**Table 3.** Results of the analysis of commercial meat products from the partridge using the primers RHOD-FW/RHOD-REV

Animal species on the label	Type of product	Nucleotide found on the SNP position <sup>1</sup>	Accession number of the nucleotide sequences
Red-legged partridge	Fresh meat A, B	T	FN675785, FN675786
Red-legged partridge	Fresh meat C	C	FN811344
Red-legged partridge	Fresh meat D to O	T	FN675787, FN811182, FN811347- FN811356
Red-legged partridge	Braised meat B	T/C	FN811363
Red-legged partridge	Pickled meat B, C, F, G	T	FN811357- FN811360
Red-legged partridge	Pickled meat H	C	FN811345
Red-legged partridge	Meat in sauce A	T/C	FN811364
Red-legged partridge	Meat in sauce B	C	FN811346
Game red-legged partridge	Boned pickled meat D, E	T	FN811361, FN811362

<sup>1</sup>T = thymine; C = cytosine.

ability in partridge populations (Baratti et al., 2005; Barbanera et al., 2005, 2007; García and Arruga, 2006; Ferrero et al., 2007; Tejedor et al., 2007). In contrast, considerably fewer studies have been published so far with regard to partridge meat product authentication using PCR techniques. Among them, PCR-RFLP-based methods (Rojas et al., 2008, 2009a; Stamoulis et al., 2010) may be unsuitable for species identification in the analysis of thermally processed meats harboring highly fragmented DNA because relatively large amplicons are commonly required to carry out enzymatic restriction of DNA. In addition, the applicability of the PCR-RFLP methodology is limited in the analysis of complex meat products (e.g., pâtés, minced meats) that include 2 or more species in their composition because the results obtained after digestion of the PCR products might show a combination of miscellaneous restriction patterns representing all the possible species included in the adulterated sample (Girish et al., 2005).

Species-specific PCR (Rojas et al., 2010a) or real-time PCR assays (Rojas et al., 2010b) have also been reported previously for the identification of partridge meat. The reported PCR technique using species-specific primers (Rojas et al., 2010a) was suitable for the analysis of heat-treated partridge meat products and admixed meats. However, this technique was capable of detecting partridge species only from the genus *Alectoris* because it was based in the use of primers targeting a fragment from the mitochondrial D-loop gene conserved among partridge species of this genus. Thus, this method could not be used for the specific identification of red-legged partridge meat or for the detection of gray partridge meat.

The real-time PCR approach (Rojas et al., 2010b) was also successfully applied to the analysis of processed partridge meat products. This PCR format allowed detection measurements to be performed at an early stage in the PCR process and eliminated the need for agarose gel electrophoresis. However, the high cost of real-time PCR limits its application in some food control laboratories that cannot afford this expensive equipment.

In conclusion, the results obtained in the present work demonstrate that the PCR assays proposed using species-specific primers designed to target the mi-

tochondrial 12S rRNA gene and PCR sequencing of the nuclear growth hormone gene represent a powerful alternative for the detection of partridge meat and the specific identification of red-legged partridge meat products. Consequently, this methodology could be used in inspection programs to enforce accurate labeling of partridge meat products, thereby protecting both producers and consumers against partridge meat adulteration and misrepresentation.

## ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by Grant No. AGL 2007-60077 from the Ministerio de Educación y Ciencia of Spain and the *Programa de Vigilancia Sanitaria* 2009/AGR/1489 from the Comunidad de Madrid (Spain). María Rojas, Miguel Ángel Pavón, and Nicolette Pegels are recipients of a fellowship from the Ministerio de Educación (Madrid, Spain). We are indebted to Juan José Negro Balmaseda (Estación Biológica de Doñana, Sevilla, Spain), and Susana Dunner (Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, Spain) for kindly supplying the red-legged partridge and barbara partridge samples.

## REFERENCES

- Arruga, M. V., C. B. García, and L. V. Monteagudo. 2007. DNA analysis-based method for the identification of species of partridge and the detection of hybrids of the genus *Alectoris*. Pons Arino, A., assignee. European Patent No. 1,865,069A1.
- Baratti, M., M. Ammannati, C. Magnelli, and F. Dessi-Fulgheri. 2005. Introgression of *chukar* genes into a reintroduced red-legged partridge (*Alectoris rufa*) population in central Italy. *Anim. Genet.* 36:29-35.
- Barbanera, F., M. Guerrini, P. Hadjigerou, P. Panayides, C. Sokos, P. Wilkinson, A. A. Khan, B. Y. Khan, F. Cappelli, and F. Dini. 2007. Genetic insight into Mediterranean *chukar* (*Alectoris chukar*, Galliformes) populations inferred from mitochondrial DNA and RAPD markers. *Genetica* 131:287-298.
- Barbanera, F., J. J. Negro, G. Di Giuseppe, F. Bertoni, F. Cappelli, and F. Dini. 2005. Analysis of the genetic structure of red-legged partridge (*Alectoris rufa*, Galliformes) populations by means of mitochondrial DNA and RAPD markers: A study from central Italy. *Biol. Conserv.* 122:275-287.
- Bellagamba, F., V. M. Moretti, S. Comincini, and F. Valfrè. 2001. Identification of species in animal feedstuffs by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis of mitochondrial DNA. *J. Agric. Food Chem.* 49:3775-3781.



- Che Man, Y. B., A. A. Aida, A. R. Raha, and R. Son. 2007. Identification of pork derivatives in food products by species-specific polymerase chain reaction (PCR) for halal verification. *Food Contr.* 18:885–889.
- Colombo, F., E. Marchisio, A. Pizzini, and C. Cantoni. 2002. Identification of the goose species (*Anser anser*) in Italian "Mortara" salami by DNA sequencing and a polymerase chain reaction with an original primer pair. *Meat Sci.* 61:291–294.
- De Juana, E., R. Gutiérrez, and J. A. Lorenzo. 2000. A List of the Birds of Spain. Mimeograph Rep. Spanish Rarities Committee, Barcelona, Spain.
- Fajardo, V., I. González, I. López-Calleja, I. Martín, P. E. Hernández, T. García, and R. Martín. 2006. PCR-RFLP authentication of meats from red deer (*Cervus elaphus*), fallow deer (*Dama dama*), roe deer (*Capreolus capreolus*), cattle (*Bos taurus*), sheep (*Ovis aries*), and goat (*Capra hircus*). *J. Agric. Food Chem.* 54:1144–1150.
- Fajardo, V., I. González, I. Martín, M. Rojas, P. E. Hernández, T. García, and R. Martín. 2007. Differentiation of European wild boar (*Sus scrofa scrofa*) and domestic swine (*Sus scrofa domestica*) meats by PCR analysis targeting the mitochondrial D-loop and the nuclear melanocortin receptor 1 (*MCR1*) genes. *Meat Sci.* 78:314–322.
- Ferrero, M. E., E. González-Jara, J. A. Blanco-Aguilar, I. Sánchez-Barbudo, and J. A. Dávila. 2007. Sixteen new polymorphic microsatellite markers isolated for red-legged partridge (*Alectoris rufa*) and related species. *Mol. Ecol. Notes* 7:1349–1351.
- García, C. B., and M. V. Arruga. 2006. Comparative genetic analysis between red-legged partridges (*Alectoris rufa*) and chukar partridges (*A. chukar*): Identification of single-nucleotide polymorphisms. *Anim. Res.* 55:335–342.
- Girish, P. S., A. S. R. Anjaneyulu, K. N. Viswas, M. Anand, N. Rajkumar, B. M. Shivakumar, and B. Sharma. 2004. Sequence analysis of mitochondrial 12S rRNA gene can identify meat species. *Meat Sci.* 66:551–556.
- Girish, P. S., A. S. R. Anjaneyulu, K. N. Viswas, B. M. Shivakumar, M. Anand, M. Patel, and B. Sharma. 2005. Meat species identification by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) of mitochondrial 12S rRNA gene. *Meat Sci.* 70:107–112.
- Government of Spain. 1989. Law 4/1989 for the Conservation of Natural Landscapes and Wild Fauna and Flora. Boletín Oficial del Estado, 74/1989:8262–8269.
- Guerrini, M., and F. Barbanera. 2009. Noninvasive genotyping of the red-legged partridge (*Alectoris rufa*, Phasianidae): Semi-nested PCR of mitochondrial DNA from feces. *Biochem. Genet.* 47:873–883.
- Kesmen, Z., F. Sahin, and H. Yetim. 2007. PCR assay for the identification of animal species in cooked sausages. *Meat Sci.* 77:649–653.
- Martín, I., T. García, V. Fajardo, I. López-Calleja, M. Rojas, P. E. Hernández, I. González, and R. Martín. 2007. Mitochondrial markers for the detection of four duck species and the specific identification of Muscovy duck in meat mixtures using the polymerase chain reaction. *Meat Sci.* 76:721–729.
- Martínez-Carrasco, C., A. Bernabé, J. M. Ortiz, and F. D. Alonso. 2005. Experimental toxoplasmosis in red-legged partridges (*Alectoris rufa*) fed *Toxoplasma gondii* oocysts. *Vet. Parasitol.* 130:55–60.
- Martínez-Fresno, M., N. Henriques-Gil, and P. Arana. 2008. Mitochondrial DNA sequence variability in red-legged partridge, *Alectoris rufa*, Spanish populations and the origins of genetic contamination from *A. chukar*. *Conserv. Genet.* 9:1223–1231.
- Montiel-Sosa, J. F., E. Ruiz-Pesini, J. Montoya, P. Roncalés, M. J. López-Pérez, and A. Pérez-Martos. 2000. Direct and highly species-specific detection of pork meat and fat in meat products by PCR amplification of mitochondrial DNA. *J. Agric. Food Chem.* 48:2829–2832.
- Pascal, G., and S. Mahé. 2001. Identity, traceability, acceptability and substantial equivalence of food. *Cell. Mol. Biol.* 47:1329–1342.
- Peter, C., C. Brünen-Nieweler, K. Cammann, and T. Borchers. 2004. Differentiation of animal species in food by oligonucleotide microarray hybridization. *Eur. Food Res. Technol.* 219:286–293.
- Prado, M., P. Calo-Mata, T. G. Villa, A. Cepeda, and J. Barros-Velázquez. 2007. Co-amplification and sequencing of a cytochrome *b* fragment affecting the identification of cattle in PCR-RFLP food authentication studies. *Food Chem.* 105:436–442.
- Reale, S., A. Campanella, A. Merigoli, and F. Pilla. 2008. A novel method for species identification in milk and milk-based products. *J. Dairy Res.* 75:107–112.
- Rojas, M., I. González, V. Fajardo, I. Martín, P. E. Hernández, T. García, and R. Martín. 2008. Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism authentication of raw meats from game birds. *J. AOAC Int.* 91:1416–1422.
- Rojas, M., I. González, V. Fajardo, I. Martín, P. E. Hernández, T. García, and R. Martín. 2009a. Identification of raw and heat-processed meats from game bird species by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism of the mitochondrial D-loop region. *Poult. Sci.* 88:669–679.
- Rojas, M., I. González, V. Fajardo, I. Martín, P. E. Hernández, T. García, and R. Martín. 2009b. Authentication of meats from quail (*Coturnix coturnix*), pheasant (*Phasianus colchicus*), partridge (*Alectoris* spp.), and guinea fowl (*Numida meleagris*) using polymerase chain reaction targeting specific sequences from the mitochondrial 12S rRNA gene. *Food Contr.* 20:896–902.
- Rojas, M., I. González, M. A. Pavón, N. Pegels, P. E. Hernández, T. García, and R. Martín. 2010a. Polymerase chain reaction assay for verifying the labeling of meat and commercial meat products from game birds targeting specific sequences from the mitochondrial d-loop region. *Poult. Sci.* 89:1021–1032.
- Rojas, M., I. González, M. A. Pavón, N. Pegels, P. E. Hernández, T. García, and R. Martín. 2010b. A novel TaqMan real-time polymerase chain reaction assay for verifying the authenticity of meat and commercial meat products from game birds. *Food Addit. Contam. A Chem. Anal. Control Expo. Risk Assess.* 27:749–763.
- Sáez, R., Y. Sanz, and F. Toldrá. 2004. PCR-based fingerprinting techniques for rapid detection of animal species in meat products. *Meat Sci.* 66:659–665.
- Sasazaki, S., H. Mutoh, K. Tsurifune, and H. Mannen. 2007. Development of DNA markers for discrimination between domestic and imported beef. *Meat Sci.* 77:161–166.
- Stamoulis, P., C. Stamatis, T. Sarafidou, and Z. Mamuris. 2010. Development and application of molecular markers for poultry meat identification in food chain. *Food Contr.* 21:1061–1065.
- Tejedor, M. T., L. V. Monteagudo, and M. V. Arruga. 2006. DNA single strand conformation polymorphisms (SSCP's) studies on Spanish red-legged partridges. *Wildl. Biol. Pract.* 2:8–12.
- Tejedor, M. T., L. V. Monteagudo, and M. V. Arruga. 2008. Microsatellite markers for the analysis of genetic variability and relatedness in red-legged partridge (*Alectoris rufa*) farms in Spain. *Res. Vet. Sci.* 85:62–67.
- Tejedor, M. T., L. V. Monteagudo, S. Mautner, E. Hadjisterkotis, and M. V. Arruga. 2007. Introgression of *Alectoris chukar* genes into a Spanish wild *Alectoris rufa* population. *J. Hered.* 98:179–182.
- Verkaar, E. L. C., I. J. Nijman, K. Boutaga, and J. A. Lenstra. 2002. Differentiation of cattle species in beef by PCR-RFLP of mitochondrial and satellite DNA. *Meat Sci.* 60:365–369.
- Yin, R. H., W. L. Bai, J. M. Wang, C. D. Wu, Q. L. Dou, R. L. H. J. B. Yin, and G. B. Luo. 2009. Development of an assay for rapid identification of meat from yak and cattle using polymerase chain reaction technique. *Meat Sci.* 83:38–44.
- Zhang, J., H. Huang, Z. Cai, and L. Huang. 2007. Species identification in salted products of red snappers by semi-nested PCR-RFLP based on the mitochondria 12S rRNA gene sequence. *Food Contr.* 18:1331–1336.



Contents lists available at ScienceDirect

## Animal Feed Science and Technology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/anifeedsci](http://www.elsevier.com/locate/anifeedsci)

## Short communication

Application of species-specific polymerase chain reaction assays to verify the labeling of quail (*Coturnix coturnix*), pheasant (*Phasianus colchicus*) and ostrich (*Struthio camelus*) in pet foods

M. Rojas, I. González, S. De la Cruz, P.E. Hernández, T. García, R. Martín\*

Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense, 28040 Madrid, Spain

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 4 November 2010

Received in revised form 12 May 2011

Accepted 20 May 2011

## Keywords:

Species identification

Pet food

12S rRNA

18S rRNA

Species-specific PCR

## ABSTRACT

Species-specific polymerase chain reaction (PCR) assays have been applied to verify the labeling of pet foods containing quail, pheasant, and ostrich. The method combines the use of quail, pheasant, ostrich, chicken, duck, pig and fish specific primers that amplify small fragments (amplicons <200 base pairs) of the mitochondrial 12S rRNA gene and a positive control primer pair that amplifies a 141 bp fragment of the nuclear 18S rRNA gene from eukaryotic DNA. The applicability of the assay was tested through the analysis of 100 commercial dog and cat food products. The reported PCR technique successfully detected the presence of the target species in 88 of the analyzed samples. However, the target species was not detected in 12 samples indicating a possible fraud in the labeling of these products. The results obtained suggest that the reported PCR method may represent a suitable tool for the detection of pet food mislabeling.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

Recent food scares and poor practice on part of some producers have clearly reinforced public awareness regarding the origin of animal and pet food products. According to the current legislation, all the ingredients used for the preparation of farm animal feedstuffs must be declared on the label. With regard to pet food, labels must indicate either all the ingredients present in the product or the categories to which the ingredients belong (European Commission, 2009). In this context, the identification of animal species has been gaining in practical importance as a tool to avoid unfair competition and to assure accurate and truthful labeling. The ability to authenticate feed and pet food products is also of mayor concern to the feed and pet food industry since manufacturers must be able to confirm the authenticity of components of their products in order to comply with government legislation.

In recent years, the pet food industry has consistently grown all over the world with a huge offer of different pet foods available in the market (Kang and Kondo, 2002). The competition among pet food companies together with the demand from pet owners for high quality products has led to the need to explore new ingredients for the preparation of pet food. In this framework, the use of tissues from novel animal species such as quail (*Coturnix coturnix*), pheasant (*Phasianus colchicus*), or ostrich (*Struthio camelus*) as ingredient in pet food has been gaining in popularity. These species can be found in gourmet pet foods and hypoallergenic formulas for animals suffering from food allergy. However, the high price of these pet food products could lead to fraudulent practices involving the substitution of quail, pheasant and ostrich with other less valuable species.

\* Corresponding author. Tel.: +34 913943752; fax: +34 913943743.  
E-mail address: [rmartins@vet.ucm.es](mailto:rmartins@vet.ucm.es) (R. Martín).

**Table 1**  
DNA sequences of the primers used in this study.

Primers	Length (bp)	Sequence (5'–3')	Description	Amplicon length (bp)	Source
18SpEU-DIR	29	GGTACTGACGAAAAATAACAATACAGGAC	Positive control forward primer	141	Fajardo et al. (2008)
18SpEU-INV	25	ATACGCTATTGGAGCTGGAATTACC	Positive control reverse primer		
12SCOT-FW	27	GATTTAGCAGTAAATGGGATCACTTT	Quail forward primer	129	Rojas et al. (2009)
12SCOT-REV	22	TCGTCTTTGGCTTAATGGTTGG	Quail reverse primer		
12SPHA-FW	23	AGTGGTCATATGTTATCCTCACC	Pheasant forward primer	113	Rojas et al. (2009)
12SPHA-REV	21	GGGGTAAAATTAGTCGTGGAG	Pheasant reverse primer		
12SSTH-FW	27	CCCTTTAAAGACATCTGGTATTGTGAG	Ostrich forward primer	155	Rojas et al. (2011)
12SSTH-REV	24	TAAATTGTAGGCTCTCTGGGGTTC	Ostrich reverse primer		
12SpCHICKENDIR	26	ACATAGAACAACGAAAAAGGATGTG	Chicken forward primer	95	Martín et al. (2007a)
12SpCHICKENINV	23	CGTCTTAAAGTGAGCTTAGGGCG	Chicken reverse primer		
12SDUCKSDIR	24	CATAATTAATACCTGTAAATGCC	Duck forward primer	64	Martín et al. (2007b)
12S-REV	27	TCCGGTACACTTACCTGTTCAGACTT	Duck reverse primer		
12SpCERDODIR	18	CCTCCTCAAGCATGTAGT	Pig forward primer	75	Martín et al. (2008)
12SpCERDOINV	23	GTTACGACTTGTCTCTCTGTGCA	Pig reverse primer		
12SpFISHDIR	26	CCACCTAGAGGAGCCTGTTCTAGAAC	Fish forward primer	87	Martín et al. (2010)
12SpFISHINV	21	GACGACGGCGGTATATAGGCG	Fish reverse primer		

Consequently, there is a need for reliable and accurate methods for the identification of these species in such varieties of pet food. The development of these methods should protect both producers and pet owners from mislabeling and fraudulent species substitution and would allow verifying compliance with pet food labeling requirements.

Several analytical methods are currently available for the identification of animal species in feedstuffs. Among them, DNA-based methods have been well received because of the relative stability of the DNA molecule under the conditions associated with the high temperature, pressures and chemical treatments used in the preparation of feed and pet food (Zhang et al., 2007). Among DNA-based methods, polymerase chain reaction (PCR) coupled with complementary techniques such as sequencing or restriction fragment length polymorphism (RFLP), has been extensively applied for species identification (Girish et al., 2004; Prado et al., 2007a). Alternatively, PCR using species-specific primers can be also used for species identification without the need of further sequencing or digestion of the PCR products with restriction enzymes (Dalmaso et al., 2004; Krcmar and Rencova, 2001).

The objective of this study was to develop a PCR method for the specific identification of quail, pheasant and ostrich in pet food. The assay is based on the selective amplification of mitochondrial 12S rRNA sequences from the selected species. In addition, species-specific primers for chicken, duck, pig and fish species were also used to assess the accuracy of the ingredient statements from pet food labels.

## 2. Material and methods

### 2.1. Selection and preparation of samples and DNA extraction

Authentic reference samples of quail (*C. coturnix*), pheasant (*P. colchicus*) and ostrich (*S. camelus*) meat were provided by Antonio de Miguel (Madrid, Spain). Chicken (*Gallus gallus*), Muscovy duck (*Cairina moschata*), pig (*Sus scrofa domestica*) and tuna (*Thunnus* spp.) reference meat samples were purchased from different retail markets and local abattoirs (Madrid, Spain). Meat samples were processed immediately or stored frozen at  $-20^{\circ}\text{C}$  until use.

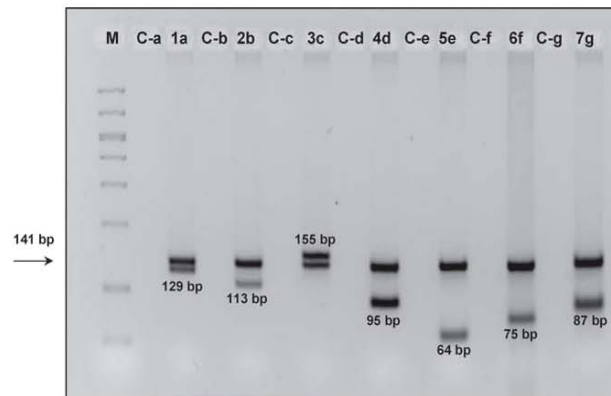
Commercial pet food products of several brands were purchased from various retail markets (Spain). These products included 32 canned and 10 dry cat food samples containing quail, 17 canned cat food and 12 canned dog food samples containing pheasant, and 15 dry and 14 semi-moist dog food samples containing ostrich. Pet food samples were stored at room temperature (approximately  $25^{\circ}\text{C}$ ) until use.

Total DNA was extracted from samples following a previously described method (Rojas et al., 2008). DNA concentration was measured with a NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop Technologies Inc., Montchanin, DE).

### 2.2. Primers design

The primers used in this work were those designed in previous works for the specific identification of quail, pheasant, ostrich, chicken, duck, pig and fish species. In addition, a primer pair designed for the amplification of a conserved fragment in eukaryotic organisms was used as positive control of the assay. The sequences and description of the primers are summarized in Table 1.





**Fig. 1.** Electrophoretic analysis of the amplification products obtained using (a) quail, (b) pheasant, (c) ostrich, (d) chicken, (e) duck, (f) pig, and (g) fish species-specific primers, combined with positive control primers. Samples correspond to (1) quail, (2) pheasant, (3) ostrich, (4) chicken, (5) Muscovy duck, (6) pig, and (7) tuna reference meat samples. M, molecular weight marker 50–1000 bp ladder (Biomarker Low, BioVentures Inc.). C-, negative control.

### 2.3. PCR conditions

DNA amplifications were carried out in a final volume of 25  $\mu$ L containing 10 ng of template DNA, 2 mM  $MgCl_2$ , 200  $\mu$ M of each dNTP, 25 pmol (chicken primers), 10 pmol (quail, ostrich, duck and pig primers) or 5 pmol (pheasant and fish primers) and 1 unit of *Tth* DNA polymerase (Biotoools, Madrid, Spain) in a reaction buffer containing 75 mM Tris–HCl, pH 9.0; 50 mM KCl, 20 mM  $(NH_4)_2SO_4$ , and 0.001% bovine serum albumin (BSA). A PCR reaction using DNA extracted from raw muscle samples of the target species and a negative control using sterile water in place of DNA were included in each PCR assay. PCR amplification was carried out in a Progene thermal cycler (Techne Ltd., Cambridge, UK). Forty amplification cycles were performed with the following step-cycle profile: strand denaturation at 93  $^{\circ}C$  for 30 s, primer annealing at 65  $^{\circ}C$  (for quail), 63  $^{\circ}C$  (for ostrich and fish), 61  $^{\circ}C$  (for chicken), 60  $^{\circ}C$  (for pheasant), or 55  $^{\circ}C$  (for duck and pig) for 30 s and primer extension at 72  $^{\circ}C$  for 45 s. The last extension step was 5 min longer. An initial denaturation at 93  $^{\circ}C$  for 2 min was carried out to improve the final result. Positive control amplifications were set using 5 pmol of 18SpEUDIR/18SpEUIINV primers combined in duplex PCR with each species-specific primer pair.

PCR products (10  $\mu$ L) were electrophoresed in a 3.5% MS8 (Hispanlab S.A., Torrejón, Spain) agarose gel. Each agarose gel contained 1  $\mu$ g/mL ethidium bromide in Tris-acetate buffer (0.04 M Tris-acetate and 0.001 M EDTA, pH 8.0). Electrophoretic separation was performed at 90 V for 60 min and the resulting DNA fragments were visualized by UV transillumination and analyzed using a Geldoc 1000 UV Fluorescent Gel Documentation System-PC (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA).

## 3. Results and discussion

In order to carry out the analysis of pet food, species-specific primers for quail, pheasant, ostrich, chicken, duck, pig and fish were combined in duplex PCR with a positive control primer pair. As can be seen in Fig. 1, the species-specific primers amplified specific fragments of 129, 113, 155, 95, 64, 75 and 87 bp from the 12S rRNA gene of quail, pheasant, ostrich, chicken, Muscovy duck, pig and tuna reference samples, respectively, whereas the positive control primers amplified a conserved fragment of 141 bp from the nuclear 18S RNA gene in all the species tested. The use of such positive control is important to reveal possible failures in amplification reactions due to DNA degradation, equipment deficiency or presence of nucleic acid inhibitors.

To check the applicability of the species-specific primers to the analysis of pet food, 100 commercial pet food samples, including dry, canned and semi-moist formulas were tested. In most cases, the results obtained from the analysis of pet food products agreed with the declaration of quail, pheasant, or ostrich content on the label. However, twelve canned food products for dog which were supposed to contain pheasant were not amplified with the pheasant-specific primers. Nevertheless, successful amplification was obtained with the positive control primers, suggesting a possible fraud in the labeling of these pet food samples (Table 2). In addition, pet food products containing more than one species in their composition were also tested for the presence of other animal species stated in the label such as chicken, duck, pig and tuna. For this purpose, PCR assays using species-specific primers for the mentioned species were also carried out. In all the samples tested, the results obtained were in accordance with the species composition stated in the labels including the pet food samples in which pheasant was not detected (Table 2).

Although many researchers have centered their attention on the development of sensitive and versatile PCR methodologies for the identification of animal species in farm animal feedstuffs (Kusama et al., 2004; Prado et al., 2007b), lesser attention has been given so far with regard to pet food authentication (Myers et al., 2004; Wang et al., 2004). Moreover, the vast majority of PCR applications for species identification published to date are focused in domestic species such as cattle, sheep, goat, pig, turkey, chicken, duck, or goose (Martín et al., 2007a, 2008; Tajima et al., 2002). By contrast, the range of



**Table 2**

Results for the PCR analysis of commercial pet food products using quail, pheasant, ostrich, chicken, duck, pig, and fish specific primers, and positive control conserved primers.

Type of product	Species on the label	Quail specific primers	Pheasant specific primers	Ostrich specific primers	Chicken specific primers	Duck specific primers	Pig specific primers	Fish specific primers	Positive control primers
Canned cat food A	Q, T	129bp	– <sup>a</sup>	–	–	–	–	87 bp	141 bp
Canned cat food B	Q, T	129bp	–	–	–	–	–	87 bp	141 bp
Canned cat food C	Q, T	129bp	–	–	–	–	–	87 bp	141 bp
Canned cat food D	Q, T	129bp	–	–	–	–	–	87 bp	141 bp
Canned cat food E	Q, T	129bp	–	–	–	–	–	87 bp	141 bp
Canned cat food F	Q, T	129bp	–	–	–	–	–	87 bp	141 bp
Canned cat food G	Q, T	129bp	–	–	–	–	–	87 bp	141 bp
Canned cat food H	Q, T	129bp	–	–	–	–	–	87 bp	141 bp
Canned cat food I	Q, T	129bp	–	–	–	–	–	87 bp	141 bp
Canned cat food J	Q, T	129bp	–	–	–	–	–	87 bp	141 bp
Canned cat food K	Q, C	129bp	–	–	95 bp	–	–	–	141 bp
Canned cat food L	Q, C	129bp	–	–	95 bp	–	–	–	141 bp
Canned cat food M	Q, C	129bp	–	–	95 bp	–	–	–	141 bp
Canned cat food N	Q, C	129bp	–	–	95 bp	–	–	–	141 bp
Canned cat food O	Q, C	129bp	–	–	95 bp	–	–	–	141 bp
Canned cat food P	Q, C	129 bp	–	–	95 bp	–	–	–	141 bp
Canned cat food Q	Q, C	129bp	–	–	95 bp	–	–	–	141 bp
Canned cat food R	Q, C	129bp	–	–	95 bp	–	–	–	141 bp
Canned cat food S	Q, C	129bp	–	–	95 bp	–	–	–	141 bp
Canned cat food T	Q, C	129bp	–	–	95 bp	–	–	–	141 bp
Canned cat food U	Q, C	129bp	–	–	95 bp	–	–	–	141 bp
Canned cat food V	Q, C	129bp	–	–	95 bp	–	–	–	141 bp
Canned cat food W	Q, T	129bp	–	–	–	–	–	87 bp	141 bp
Canned cat food X	Q, T	129bp	–	–	–	–	–	87 bp	141 bp
Canned cat food Y	Q, T	129bp	–	–	–	–	–	87 bp	141 bp
Canned cat food Z	Q, T	129bp	–	–	–	–	–	87 bp	141 bp
Canned cat food AA	Q, T	129bp	–	–	–	–	–	87 bp	141 bp
Canned cat food BB	Q, T	129bp	–	–	–	–	–	87 bp	141 bp
Canned cat food CC	Q, T	129bp	–	–	–	–	–	87 bp	141 bp
Canned cat food DD	Q, T	129bp	–	–	–	–	–	87 bp	141 bp
Canned cat food EE	Q, T	129bp	–	–	–	–	–	87 bp	141 bp
Canned cat food FF	Q, T	129bp	–	–	–	–	–	87 bp	141 bp
Canned cat food GG	P, D	–	113bp	–	–	64bp	–	–	141 bp
Canned cat food HH	P, D	–	113bp	–	–	64bp	–	–	141 bp
Canned cat food II	P, D	–	113bp	–	–	64bp	–	–	141 bp
Canned cat food JJ	P, D	–	113bp	–	–	64bp	–	–	141 bp
Canned cat food KK	P, D	–	113bp	–	–	64bp	–	–	141 bp
Canned cat food LL	P, D	–	113bp	–	–	64bp	–	–	141 bp
Canned cat food MM	P, D	–	113bp	–	–	64bp	–	–	141 bp
Canned cat food NN	P, D	–	113bp	–	–	64bp	–	–	141 bp
Canned cat food OO	P	–	113bp	–	–	–	–	–	141 bp
Canned cat food PP	P	–	113bp	–	–	–	–	–	141 bp
Canned cat food QQ	P	–	113bp	–	–	–	–	–	141 bp
Canned cat food RR	P	–	113bp	–	–	–	–	–	141 bp
Canned cat food SS	P	–	113bp	–	–	–	–	–	141 bp
Canned cat food TT	P	–	113bp	–	–	–	–	–	141 bp
Canned cat food UU	P	–	113bp	–	–	–	–	–	141 bp
Canned cat food VV	P	–	113bp	–	–	–	–	–	141 bp
Canned cat food WW	P	–	113bp	–	–	–	–	–	141 bp
Dry cat food A	Q, PI	129bp	–	–	–	–	75 bp	–	141 bp
Dry cat food B	Q, PI	129bp	–	–	–	–	75 bp	–	141 bp
Dry cat food C	Q, PI	129bp	–	–	–	–	75 bp	–	141 bp
Dry cat food D	Q, PI	129bp	–	–	–	–	75 bp	–	141 bp
Dry cat food E	Q, PI	129bp	–	–	–	–	75 bp	–	141 bp
Dry cat food F	Q, PI	129bp	–	–	–	–	75 bp	–	141 bp
Dry cat food G	Q, PI	129bp	–	–	–	–	75 bp	–	141 bp
Dry cat food H	Q, PI	129bp	–	–	–	–	75 bp	–	141 bp
Dry cat food I	Q, PI	129bp	–	–	–	–	75 bp	–	141 bp
Dry cat food J	Q, PI	129bp	–	–	–	–	75 bp	–	141 bp
Canned dog food A	P, C	–	–	–	95 bp	–	–	–	141 bp
Canned dog food B	P, C	–	–	–	95 bp	–	–	–	141 bp
Canned dog food C	P, C	–	–	–	95 bp	–	–	–	141 bp
Canned dog food D	P, C	–	–	–	95 bp	–	–	–	141 bp
Canned dog food E	P, C	–	–	–	95 bp	–	–	–	141 bp
Canned dog food F	P, C	–	–	–	95 bp	–	–	–	141 bp

Table 2 (Continued)

Type of product	Species on the label	Quail specific primers	Pheasant specific primers	Ostrich specific primers	Chicken specific primers	Duck specific primers	Pig specific primers	Fish specific primers	Positive control primers
Canned dog food G	P, C	–	–	–	95 bp	–	–	–	141 bp
Canned dog food H	P, C	–	–	–	95 bp	–	–	–	141 bp
Canned dog food I	P, C	–	–	–	95 bp	–	–	–	141 bp
Canned dog food J	P, C	–	–	–	95 bp	–	–	–	141 bp
Canned dog food K	P, C	–	–	–	95 bp	–	–	–	141 bp
Canned dog food L	P, C	–	–	–	95 bp	–	–	–	141 bp
Dry dog food A	O, C	–	–	155 bp	95 bp	–	–	–	141 bp
Dry dog food B	O, C	–	–	155 bp	95 bp	–	–	–	141 bp
Dry dog food C	O, C	–	–	155 bp	95 bp	–	–	–	141 bp
Dry dog food D	O, C	–	–	155 bp	95 bp	–	–	–	141 bp
Dry dog food E	O, C	–	–	155 bp	95 bp	–	–	–	141 bp
Dry dog food F	O, C	–	–	155 bp	95 bp	–	–	–	141 bp
Dry dog food G	O, C	–	–	155 bp	95 bp	–	–	–	141 bp
Dry dog food H	O, C	–	–	155 bp	95 bp	–	–	–	141 bp
Dry dog food I	O, C	–	–	155 bp	95 bp	–	–	–	141 bp
Dry dog food J	O	–	–	155 bp	–	–	–	–	141 bp
Dry dog food K	O	–	–	155 bp	–	–	–	–	141 bp
Dry dog food L	O	–	–	155 bp	–	–	–	–	141 bp
Dry dog food M	O	–	–	155 bp	–	–	–	–	141 bp
Dry dog food N	O	–	–	155 bp	–	–	–	–	141 bp
Dry dog food O	O	–	–	155 bp	–	–	–	–	141 bp
Semi-moist dog food A	O	–	–	155 bp	–	–	–	–	141 bp
Semi-moist dog food B	O	–	–	155 bp	–	–	–	–	141 bp
Semi-moist dog food C	O	–	–	155 bp	–	–	–	–	141 bp
Semi-moist dog food D	O	–	–	155 bp	–	–	–	–	141 bp
Semi-moist dog food E	O	–	–	155 bp	–	–	–	–	141 bp
Semi-moist dog food F	O	–	–	155 bp	–	–	–	–	141 bp
Semi-moist dog food G	O	–	–	155 bp	–	–	–	–	141 bp
Semi-moist dog food H	O	–	–	155 bp	–	–	–	–	141 bp
Semi-moist dog food I	O	–	–	155 bp	–	–	–	–	141 bp
Semi-moist dog food J	O	–	–	155 bp	–	–	–	–	141 bp
Semi-moist dog food K	O	–	–	155 bp	–	–	–	–	141 bp
Semi-moist dog food L	O	–	–	155 bp	–	–	–	–	141 bp
Semi-moist dog food M	O	–	–	155 bp	–	–	–	–	141 bp
Semi-moist dog food N	O	–	–	155 bp	–	–	–	–	141 bp

Q, Quail; P, Pheasant; O, Ostrich; T, Tuna; C, Chicken; D, Duck; PI, Pig.

<sup>a</sup> Means no amplification of the PCR product.

assays available for the detection of less common animal species in feed is relatively limited (Bottero et al., 2003; Martín et al., 2007c). To our knowledge, no reports are available to date on species-specific PCR detection of quail, pheasant and ostrich in pet food.

Compared to alternative techniques for species identification such as direct sequencing of PCR products, or PCR-RFLP, PCR using specific primers offers the advantage of being cheaper, faster, and more useful for routine analysis of large numbers of samples. Besides it can be applied to the analysis of complex pet food products including two or more species in their composition for which direct sequencing or PCR-RFLP may be restricted, since results obtained after sequencing or digestion of the PCR products might show a combination of miscellaneous sequences or restriction patterns representing all the possible species included in the sample (Girish et al., 2004). The limitations of conventional species-specific PCR assays include the requirement of post amplification handling of PCR products and the dependence on agarose gel electrophoresis for analysis of the products. Moreover, this type of PCR assays can only be used for qualitative detection of the target species not being suitable for quantification of the species content in a sample. These limitations may be avoided by the use of real-time PCR. However, real-time PCR assays have the disadvantage of being much more expensive than conventional PCR using species-specific primers. In addition, suitable equipments and trained professionals are required to carry out the analysis which limits the use of the technique in many food control laboratories that can not afford these expensive equipments. By contrast, the PCR assay using species-specific primers proposed in this paper does not need special equipment and can be easily carried out by feed control laboratories and official inspectors who want to verify the identity of pet food products.

#### 4. Conclusion

This publication highlights the potential of species-specific PCR assays for the authentication of gourmet and hypoallergenic pet foods containing quail, pheasant and ostrich as ingredients. Consequently, the methodology can be used in inspection programs to enforce accurate labeling of pet food products, protecting producers and consumers against pet food misrepresentation.

## Acknowledgements

This study was supported by Grant No. AGL 2007-60077 from the Ministerio de Educación y Ciencia of Spain and the Programa de Vigilancia Sanitaria S-2009/AGR/1489 from the Comunidad de Madrid (Spain).

## References

- Bottero, M.T., Dalmaso, A., Nucera, D., Turi, R.M., Rosati, S., Squadrone, S., Gorla, M., Civera, T., 2003. Development of a PCR assay for the detection of animal tissues in ruminant feeds. *J. Food Prot.* 66, 2307–2312.
- Dalmaso, A., Fontanella, E., Piatti, P., Civera, T., Rosati, S., Bottero, M.T., 2004. A multiplex PCR assay for the identification of animal species in feedstuffs. *Mol. Cell. Probes* 18, 81–87.
- European Commission, 2009. Commission regulation 767/2009 of 13 July 2009 on the placing on the market and use of feed. *Off. J. Eur. Union* L229, 1–28.
- Fajardo, V., González, I., Martín, I., Rojas, M., Hernández, P.E., García, T., Martín, R., 2008. Real-time PCR for detection and quantification of red deer (*Cervus elaphus*), fallow deer (*Dama dama*), and roe deer (*Capreolus capreolus*) in meat mixtures. *Meat Sci.* 79, 289–298.
- Girish, P.S., Anjaneyulu, A.S.R., Viswas, K.N., Anand, M., Rajkumar, N., Shivakumar, B.M., Sharma, B., 2004. Sequence analysis of mitochondrial 12S rRNA gene can identify meat species. *Meat Sci.* 66, 551–556.
- Kang, J.H., Kondo, F., 2002. Determination of bisphenol A in canned pet foods. *Res. Vet. Sci.* 73, 177–182.
- Krcmar, P., Rencova, E., 2001. Identification of bovine-specific DNA in feedstuffs. *J. Food Prot.* 64, 117–119.
- Kusama, T., Nomra, T., Kadowaki, K., 2004. Development of primers for detection of meat and bone meal in ruminant feed and identification of the animal of origin. *J. Food Prot.* 67, 1289–1292.
- Martín, I., García, T., Fajardo, V., López-Calleja, I., Rojas, M., Pavón, M.A., Hernández, P.E., González, I., Martín, R., 2007a. Detection of chicken, turkey, duck, and goose tissues in feedstuffs, using species-specific polymerase chain reaction. *J. Anim. Sci.* 85, 452–458.
- Martín, I., García, T., Fajardo, V., López-Calleja, I., Rojas, M., Hernández, P.E., González, I., Martín, R., 2007b. Mitochondrial markers for the detection of four duck species and the specific identification of Muscovy duck in meat mixtures using the polymerase chain reaction. *Meat Sci.* 76, 721–729.
- Martín, I., García, T., Fajardo, V., Rojas, M., Pavón, M.A., Hernández, P.E., González, I., Martín, R., 2007c. Detection of cat, dog, and rat or mouse tissues in food and animal feed, using species-specific polymerase chain reaction. *J. Anim. Sci.* 85, 452–458.
- Martín, I., García, T., Fajardo, V., Rojas, M., Pegels, N., Hernández, P.E., González, I., Martín, R., 2008. SYBR-Green real-time PCR approach for the detection and quantification of pig DNA in feedstuffs. *Meat Sci.* 82, 252–259.
- Martín, I., García, T., Rojas, M., Pegels, N., Pavón, M.A., Hernández, P.E., González, I., Martín, R., 2010. Real-time polymerase chain reaction detection of fishmeal in feedstuffs. *J. AOAC Int.* 93, 1768–1777.
- Myers, M.J., Farrell, D.E., Heller, D.N., Yancy, H.F., 2004. Development of a polymerase chain reaction based method to identify species-specific components in dog food. *A.J.V.R.* 65, 99–103.
- Prado, M., Calo-Mata, P., Villa, T.G., Cepeda, A., Barros-Velázquez, J., 2007a. Co-amplification and sequencing of a cytochrome *b* fragment affecting the identification of cattle in PCR-RFLP food authentication studies. *Food Chem.* 105, 436–442.
- Prado, M., Berben, G., Fumière, O., van Duijn, G., Mensinga-Kruize, J., Reaney, S., Boix, A., von Holst, C., 2007b. Detection of ruminant meat and bone meals in animal feed by real time Polymerase Chain Reaction: result of an interlaboratory study. *J. Agric. Food Chem.* 55, 7495–7501.
- Rojas, M., González, I., Fajardo, V., Martín, I., Hernández, P.E., García, T., Martín, R., 2008. Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism authentication of raw meats from game birds. *J. AOAC Int.* 91, 1416–1422.
- Rojas, M., González, I., Fajardo, V., Martín, I., Hernández, P.E., García, T., Martín, R., 2009. Authentication of meats from quail (*Coturnix coturnix*), pheasant (*Phasianus colchicus*), partridge (*Alectoris* spp.), and guinea fowl (*Numida meleagris*) using polymerase chain reaction targeting specific sequences from the mitochondrial 12S rRNA gene. *Food Control* 20, 896–902.
- Rojas, M., González, I., Pavón, M.A., Pegels, N., Hernández, P.E., García, T., Martín, R., 2011. Application of a real-time PCR assay for the detection of ostrich (*Struthio camelus*), mislabeling in meat products from the retail market. *Food Control* 22, 523–531.
- Tajima, K., Enishi, O., Amari, M., Mitsumori, M., Kajikawa, H., Kurihara, M., Yanai, S., Matsui, H., Yasue, H., Mitsuhashi, T., Kawashima, T., Matsumoto, M., 2002. PCR detection of DNAs of animal origin in feed by primers based on sequences of short and long interspersed repetitive elements. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 66, 2247–2250.
- Wang, H.C., Lee, S.H., Chang, T.J., Wong, M.L., 2004. Examination of meat components in commercial dog and cat feed by using polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphisms (PCR-RFLPs) technique. *J. Vet. Med. Sci.* 66, 855–859.
- Zhang, J., Huang, H., Cai, Z., Huang, L., 2007. Species identification in salted products of red snappers by semi-nested PCR-RFLP based on the mitochondria 12S rRNA gene sequence. *Food Control* 18, 1331–1336.

### III.1. IDENTIFICATION OF MEAT AND MEAT PRODUCTS FROM GAME AND ALTERNATIVE POULTRY FARMING AVIAN SPECIES BY GENETIC TECHNIQUES

#### III.1.3. REAL-TIME PCR

- Novel TaqMan real-time polymerase chain reaction assay for verifying the authenticity of meat and commercial meat products from game birds.



***Food Additives and Contaminants***

*Volume 27, pages 749-763, 2010*

- Application of a real-time PCR assay for the detection of ostrich (*Struthio camelus*) mislabelling in meat products from the retail market.



***Food Control***

*Volume 22, pages 523-531, 2011*



- Development of a real-time PCR assay to control the illegal trade of meat from protected capercaillie species (*Tetrao urogallus*).



**Forensic Science International**  
Volume 210, pages 131-138, 2011

- Authentication of meat and commercial meat products from common pigeon (*Columba livia*), woodpigeon (*Columba palumbus*), and stock pigeon (*Columba oenas*) using a TaqMan<sup>®</sup> real-time PCR assay.



**Food Control**  
Volume 23, pages 369-376, 2012





## Novel TaqMan real-time polymerase chain reaction assay for verifying the authenticity of meat and commercial meat products from game birds

María Rojas, Isabel González, Miguel Ángel Pavón, Nicolette Pegels, Adriana Lago, Pablo E. Hernández, Teresa García and Rosario Martín\*

*Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense, 28040 Madrid, Spain*

(Received 30 July 2009; final version received 19 November 2009)

Species-specific real-time polymerase chain reaction (PCR) assays using TaqMan probes have been developed for verifying the labeling of meat and commercial meat products from game birds, including quail, pheasant, partridge, guinea fowl, pigeon, Eurasian woodcock and song thrush. The method combines the use of species-specific primers and TaqMan probes that amplify small fragments (amplicons <150 base pairs) of the mitochondrial 12S rRNA gene, and an endogenous control primer pair that amplifies a 141-bp fragment of the nuclear 18S rRNA gene from eukaryotic DNA. Analysis of experimental raw and heat-treated binary mixtures as well as of commercial meat products from the target species demonstrated the suitability of the assay for the detection of the target DNAs.

**Keywords:** authenticity; molecular biology; PCR; traceability; animal products; meat; processed foods

### Introduction

In developed countries, traceability of food products has become a government priority due to consumer demand for comprehensive and integrated food quality policies. Thus, food labeling legislation is an important issue due to the potential direct impact of labels on consumer decision-making (Caporale et al. 2001; Verbeke and Ward 2006). Meat products sold for public consumption must be accurately labeled regarding species content; hence, any ambiguity in the labeling practices of commercial suppliers is unacceptable. The fraudulent mislabeling of meat is a widespread problem, particularly with high added-value meat species commanding a premium price (Woolfe and Primrose 2004). This has resulted in the requirement for tests that will reliably identify the meat type in a food sample and are also sensitive and robust enough to be applied to complex food matrices (Chisholm et al. 2005).

A particular type of product in which adulteration may take place is game bird meat. This type of meat can be found in gourmet foods that tend to be eaten on special occasions and, due to their specialized nature, command high prices. As consumer's tastes and choices broaden, the demand for less common game meats is likely to grow, together with the need for reliable and rapid methods to ensure the accurate

labeling of these products (Chisholm et al. 2008). Such methods must be developed to protect both consumers and producers from frauds, but also to prevent over-exploitation and illegal trafficking of game meat products through the food market (Fajardo et al. 2007).

For meat authentication, a range of analytical approaches have been employed, broadly based on detecting either protein or DNA molecules (Teletchea et al. 2005). In comparison to proteins, DNA-based methods have proven to be more reliable owing to the stability of DNA under the high temperature, pressure and chemical treatment conditions used in the preparation of some meat products (Rodríguez et al. 2004). DNA-based methods have commonly been based on the use of conventional PCR with species-specific primers (Di Pinto et al. 2005; Che Man et al. 2007; Kesmen et al. 2007; Martín et al. 2007a; Rojas et al. 2009). However, this technique has limitations, such as the requirement of post-amplification handling of PCR products, thereby extending the risk of laboratory contamination and false-positive results, and the dependence on agarose gel electrophoresis for analysis of the products. More recent reports have focused on the use of specific primers in real-time PCR (Dooley et al. 2004; Tanabe et al. 2007; Fajardo et al. 2008a). This technique has provided sensitive and safe

\*Corresponding author. Email: rmartins@vet.ucm.es



solutions by monitoring PCR products continuously using fluorescent markers, which eliminate the need for post-PCR processing steps, easing automation of the technique and large-scale sample processing (Zhang et al. 2007).

In this paper, we describe the development of a real-time PCR approach for the detection of quail (*Coturnix coturnix*), pheasant (*Phasianus colchicus*), partridge (*Alectoris* spp.), guinea fowl (*Numida meleagris*), pigeon (*Columba* spp.), Eurasian woodcock (*Scolopax rusticola*), and song thrush (*Turdus philomelos*) DNA in raw and heat-treated meat mixtures, and commercial meat products using TaqMan fluorogenic probes as detection platform. The assay targets species-specific sequences on the 12S rRNA gene and makes use of a eukaryotic system based on an 18S rRNA fragment as endogenous control.

## Material and methods

### Selection and preparation of meat samples

Authentic muscle samples of quail (*Coturnix coturnix*), pheasant (*Phasianus colchicus*), red-legged partridge (*Alectoris rufa*), guinea fowl (*Numida meleagris*), Eurasian woodcock (*Scolopax rusticola*), woodpigeon (*Columba palumbus*), and song thrush (*Turdus philomelos*), were provided by Antonio de Miguel (Madrid, Spain). Red-legged partridge samples were also obtained from the Estación Biológica de Doñana (Sevilla, Spain) and from Hermanos Sainz (Madrid, Spain). Chukar partridge (*Alectoris chukar*) meat samples were provided by Hermanos Sainz (Madrid, Spain). Barbary partridge (*Alectoris barbara*) meat samples were obtained from the Department of Animal Production (Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid). Common pigeon (*Columba livia*) meat samples were provided by Industria del Pichón Bravío (Valladolid, Spain). Capercaillie (*Tetrao urogallus*) meat samples were obtained from the Department of Animal Pathology (Facultad de Veterinaria, Universidad Autónoma de Barcelona, Spain). Chicken (*Gallus gallus*), turkey (*Meleagris gallopavo*), Muscovy duck (*Cairina moschata*), and goose (*Anser anser*) meat samples were obtained from several local abattoirs and retail markets (Madrid, Spain). Muscle samples from cattle (*Bos taurus*), sheep (*Ovis aries*), goat (*Capra hircus*), swine (*Sus scrofa domestica*), red deer (*Cervus elaphus*), fallow deer (*Dama dama*), roe deer (*Capreolus capreolus*), chamois (*Rupicapra rupicapra*), mouflon (*Ovis ammon*), and pyrenean ibex (*Capra pyrenaica*) were also obtained from several Spanish abattoirs and meat-cutting installations. All specimens were morphologically identified by professional veterinaries before obtaining the samples. Fresh muscle portions from the selected

specimens were processed immediately or stored frozen at  $-20^{\circ}\text{C}$  until use.

Binary mixtures of quail, pheasant, partridge, guinea fowl, pigeon, Eurasian woodcock or song thrush in a chicken meat matrix were prepared using raw muscles from the selected species. For each meat mixture, six different percentages containing 50, 25, 10, 5, 1 and 0.1% (w/w) of the target species were prepared to a final weight of 100 g. Forty ml of sterile phosphate-buffered saline (PBS; 136 mM NaCl, 1.4 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 8.09 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ , and 2.6 mM KCl, pH 7.2) were added to the binary mixtures, which were homogenized with a blender (Sunbeam Oster, Boca Raton, FL, USA). Fifty grams of each mixture were sterilized at  $121^{\circ}\text{C}$  for 20 min to check the effect of thermal treatments on the technique's ability to identify the target species. Raw and sterilized binary meat mixtures were processed directly or stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  until use.

Several commercial meat products from quail, pheasant, partridge, guinea fowl, pigeon, Eurasian woodcock and song thrush, purchased from different retail markets (Spain), were also included in the analysis.

### DNA extraction

Total DNA was extracted from meat using a Wizard<sup>®</sup> DNA clean-up system kit (Promega Corp., Madison, WI, USA) as described previously (Rojas et al. 2008). DNA concentration was measured with a NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop Technologies Inc., Montchanin, DE, USA).

### Primers and oligonucleotide probes design

Based on detailed analysis and comparison of the alignment of 12S rRNA sequences from quail, pheasant, red-legged partridge, chukar partridge, barbary partridge, guinea fowl, woodpigeon, Eurasian woodcock, song thrush, capercaillie, chicken, turkey, Muscovy duck and goose (Rojas et al. 2009), seven species-specific primer pairs were designed: 12SCOT-FW/12SCOT-REV, 12SPHA-FW/12SPHA-REV, 12SALEC-FW/12SALEC-REV, 12SNUM-FW/12SNUM-REV, 12SCOLU-FW/12SCOLU-REV, 12SSCO-FW/12SSCO-REV and 12STUR-FW/12STUR-REV. They were expected to yield specific fragments of 129, 113, 141, 130, 133, 138 and 110 bp in the 12S rRNA gene of quail, pheasant, partridge, guinea fowl, pigeon, Eurasian woodcock and song thrush, respectively. Quail, pheasant, partridge and guinea fowl primers were designed previously (Rojas et al. 2009), whereas pigeon, Eurasian woodcock and song thrush primers were designed in this study. In addition, a conserved 141-bp fragment of the 18S rRNA gene

flanked by 18SpEUDIR and 18SpEUINV primers was used as endogenous control in the assay.

The EMMA program included in the EMBOSS software package version 2.0 and Primer Express 2.0 software (Perkin-Elmer/Applied Biosystems Division, Foster City, CA, USA) were used for sequence alignment and primer design.

Due to the high degree of sequence similarity between the species selected, only limited regions could be used to design species-specific primers. The different position of the designed species-specific primers meant that it was not possible to use a common probe for the seven species selected. Thus, taking into account the position of the designed primer pairs, species-specific TaqMan probes were designed for the detection of quail (QUAIL-TM), pheasant (PHEASANT-TM), Eurasian woodcock (WOODCOCK-TM) and song thrush (THRUSH-TM), respectively, whereas a common probe (BIRDS-TM) was designed for the detection of partridge, guinea fowl and pigeon species. In addition, another TaqMan probe (18SPROBE) based on conserved 18S rRNA gene sequences available in the Genbank/EMBL database for various avian and mammal species was used together with 18SpEUDIR and 18SpEUINV primers as an endogenous control in the PCR system.

TaqMan probes were designed and synthesized by TibMolBiol (Berlin, Germany) to anneal within the gene fragment generated by amplification of the corresponding target and were labeled on the 5' end with the fluorescent reporter dye 6-carboxyfluorescein (FAM) and on the 3' end with the blackberry (BBQ) fluorescent quencher.

In addition, species-specific primers developed previously (Martin et al. 2007b,c, 2008) for chicken, turkey, duck, cattle and swine were used in conventional PCR assays for the analysis of complex meat products from the target species to verify the composition stated on the labels.

Sequences and description of the primers and probes used in this work are summarized in Table 1.

#### PCR conditions

Real-time PCR was run under generic cycling conditions. The optimum PCR concentrations of primers yielding highest endpoint fluorescence and the lowest crossing point value ( $C_p$ ) were experimentally determined for each set of primers. Optimum concentrations per reaction for each primer are shown in Table 1. The PCR reactions were carried out using the LightCycler® TaqMan® Master (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany), 2 pmol of each TaqMan probe (TibMolBiol) and 5 ng of DNA. Amplification reactions were performed in a total reaction volume of 10 µl in a glass capillary tube

and were run on the LightCycler® 2.0 Instrument (Roche Applied Science, Pensberg, Germany) with the following program: 10 min at 95°C (denaturation and Taq polymerase activation), an amplification program of 35 cycles at 95°C for 10 s, 65°C (for quail, partridge, guinea fowl and Eurasian woodcock), 63°C (for pigeon and song thrush), or 60°C (for pheasant) for 30 s, and 72°C for 1 s. Samples were then cooled to 40°C for 30 s. The same program was used to amplify each of the species-specific systems along with the endogenous control PCR fragment. The crossing point value ( $C_p$ ), which refers to the cycle number where the sample's fluorescence significantly increases above the background level of fluorescence, was calculated automatically by the LightCycler® software as the first maximum of the second derivative of the curve. Unless otherwise indicated, all real-time PCR reactions were carried out in duplicate.

#### Construction of standard curves and data analysis

To check the ability of the real-time PCR method for quantitative detection, standard curves were constructed using different percentages (50, 25, 10, 5, 1 and 0.1%) of raw and sterilized binary meat mixtures from quail, pheasant, partridge, guinea fowl, pigeon, Eurasian woodcock and song thrush.

$C_p$  values obtained from each sample with the corresponding species-specific system ( $C_{pSP}$ ) were normalized according to the following equation:

$$C_{pSPS} = C_{pEU} \cdot C_{pSP} / C_{pEUS}$$

where  $C_{pSPS}$  is the normalized  $C_p$  value of the sample analyzed with the corresponding specific PCR system,  $C_{pEU}$  is the average  $C_p$  value of the standard samples (binary mixtures) in the endogenous PCR system, and  $C_{pEUS}$  is the  $C_p$  value of the sample analyzed with the endogenous PCR system.

In quantification analysis, a standard curve of standard samples plotted against their crossing point is used to determine the concentration of unknown samples. The amount of target DNA in an unknown sample can be measured by interpolation of the normalized  $C_p$  value obtained in the unknown sample in the corresponding standard curve of  $C_p$  values generated from known DNA percentages of the target species.

In addition, the correlation between the variables, crossing point ( $C_p$ ) and concentration ([I]) is semilogarithmic:

$$C_p = b \log[I] + a$$

where  $b$  is the slope and  $a$  is the intercept.

Linearity test, sensitivity, accuracy and precision parameters of the species-specific real-time PCR systems were evaluated according to previously

Table 1. DNA sequences of the primers and probes used in this study.

Primers and probes	Length (bp)	Sequence (5' to 3')	Description	Optimal concentration (nM)
18SpEU-DIR	29	GGTAGTGACGAAAAATAACAATACAGGAC	Endogenous control forward primer	300
18SpEU-INV	25	ATACGCTATTGGAGCTGGAATTACC	Endogenous control reverse primer	900
12SCOT-FW	27	GATTAGCAGTAAAAATGGGATCACTTT	Quail forward primer	300
12SCOT-REV	22	TCGTCTTTGGCTTAATGGTTGG	Quail reverse primer	900
12SPHA-FW	23	AGTGGTCATATGTTATCCTCACC	Pheasant forward primer	900
12SPHA-REV	21	GGGGTAAAAATTAGTCGTGGAG	Pheasant reverse primer	900
12SALFC-FW	26	CGACCTAAAAAACCATCTTAGTTCCCA	Partridge forward primer	300
12SALFC-REV	24	CGTAGTTCTCGGGCGGATATATTG	Partridge reverse primer	900
12SNUM-FW	24	ACCTCAAAACAATCTTAGCCACCA	Guinea fowl forward primer	300
12SNUM-REV	25	TTCTCAGCGGATACTTAGGTATTG	Guinea fowl reverse primer	900
12SCOLU-FW	26	GCCCTAAATACGACCCCTAAACTCATA	Pigeon forward primer	900
12SCOLU-REV	23	CAGCGGATGCTTTGGTTATATA	Pigeon reverse primer	900
12SSCO-FW	27	CAGCTCACCTCCAATGAGAGCTATATA	Eurasian woodcock forward primer	300
12SSCO-REV	21	ATGCCCCCTTCCGTATGGTTA	Eurasian woodcock reverse primer	300
12STUR-FW	24	GAGTGGTCGCATGTTATCCAAAGTA	Song thrush forward primer	300
12STUR-REV	29	AATCGTTGTTCTAAGATCTTCTTTGAAGA	Song thrush reverse primer	900
18SPROBE	28	FAM-AAGTGGAGTCATCTCCAATTACAGGGCCXT-BBQ	Endogenous control probe	200
QUAIL-TM	24	FAM-CTTCAAAAGCTACTAATACCGATA-BBQ	Quail probe	200
PHEASANT-TM	30	FAM-CCTAAGATCGAAGTACAATAAGCTGTCAT-BBQ	Pheasant probe	200
BIRDS-TM	25	FAM-ACGAAAGCCAGGRCACAACTGGGA-BBQ	Partridge, G. fowl and Pigeon probe	200
WOODCOCK-TM	29	FAM-CACAACCCACTAACAGACAGTTCGAGGT-BBQ	Eurasian woodcock probe	200
THRUSH-TM	29	FAM-TGAGCTGTCTATAAGCCCAAGATGCYCATA-BBQ	Song thrush probe	200

described methods (Camacho et al. 1993; ICH Harmonized Tripartite Guideline 2005). To carry out the validation of the real-time PCR technique developed in this study, three separate DNA extractions of each mixture percentage were assayed on different days, using two replicates of each sample. Precision of the assay was evaluated by comparing the coefficient of variation (CV) values obtained on three different days versus those obtained on the same day, to assess the influence of random events (day of analysis, analyst, equipment, etc.) in the data obtained from the binary mixtures.

## Results and discussion

### Real-time PCR system set-up

The primary objective of the PCR system setup was to establish an adequate marker for game bird species identification. As a target for real-time PCR, a fragment of the mitochondrial 12S rRNA gene was selected. This mitochondrial gene was chosen because it shows an appropriate degree of intra- and inter-species variability, and for the high number of copies found per cell. The presence of a high copy number of mitochondrial DNA molecules in a cell significantly increases the sensitivity of the PCR assay when the tissue is subjected to extreme processing conditions, such as sterilization (Girish et al. 2004).

To develop a robust method for detection of quail, pheasant, partridge, guinea fowl, pigeon, Eurasian woodcock and song thrush in meat mixtures and commercial meat products, seven species-specific primers and an eukaryotic primer set (endogenous control) were combined in a real-time PCR method. The use of an 18S rRNA conserved region as an endogenous control has several purposes: (a) it provides a positive control on the total PCR-amplifiable eukaryotic DNA present in the sample because factors affecting variation of target DNA amplification, such as PCR inhibition, degradation and quality of the DNA recovered from a sample, can be taken into account; (b) it traces the presence of DNA that has not been amplified by the species-specific detectors; (c) by comparison of species-specific versus endogenous control signal obtained from the samples, the inaccuracies caused by the use of standards and unknowns can be reduced.

With respect to the species-specific systems, quail, pheasant, partridge, guinea fowl, pigeon, Eurasian woodcock and song thrush primers amplified fragments of 129, 113, 141, 130, 133, 138, 110 bp in the 12S rRNA gene, respectively. These small amplicons are ideal for use with processed foods where DNA degradation can mean that larger targets (>150 bp) are not always amplified (Dooley et al. 2004). On the other hand, the endogenous control primer pair was

designed to amplify a DNA fragment of 141 bp from all the eukaryotic organisms tested with approximately the same efficiency. All PCR systems used species-specific TaqMan probes, except those for partridge, guinea fowl and pigeon species, in which, due to the similar position of the species-specific primers in the 12S rRNA sequence, a common probe was used.

### Specificity

Each species-specific PCR system was tested for its selectivity and cross reactivity by analysis of DNAs obtained from different game and domestic meat species. All species were analyzed in duplicate (two separate extractions and PCR reactions from each species).

The quail-specific system amplified a 129-bp fragment from quail ( $C_p$  value of  $20.39 \pm 0.19$ ), whereas no amplification was achieved with DNA from other game and domestic meat species. Similarly, pheasant, partridge, guinea fowl, pigeon, Eurasian woodcock and song thrush-specific systems amplified fragments of 113, 141, 130, 133, 138 and 110 bp, respectively, in samples from each corresponding target species, showing no cross amplification with DNAs from the rest of the meat species analyzed. The  $C_p$  values obtained from raw meat samples were  $17.1 \pm 0.04$  in pheasant,  $19.14 \pm 0.06$  in red-legged partridge,  $19.23 \pm 0.08$  in chukar partridge,  $19.19 \pm 0.10$  in barbary partridge,  $16.15 \pm 0.04$  in guinea fowl,  $16.32 \pm 0.07$  in common pigeon,  $16.40 \pm 0.04$  in woodpigeon,  $18.22 \pm 0.06$  in Eurasian woodcock and  $16.03 \pm 0.08$  in song thrush, whereas in non-template controls no amplification signal was detected after 35 cycles (Table 2). The endogenous control system amplified a 141-bp fragment from all the eukaryotic species analyzed. With this system, all tested species showed  $C_p$  values between  $16.69 \pm 0.03$  and  $20.30 \pm 0.06$ .

### Efficiency and detection limit

The efficiency and detection limit of the real-time PCR assay developed were evaluated from the standard curve made with the experimental binary mixtures containing 50, 25, 10, 5, 1 and 0.1% of either quail, pheasant, partridge, guinea fowl, pigeon, Eurasian woodcock or song thrush meat in a chicken meat matrix. Five ng of DNA from each binary mixture percentage was analyzed with the corresponding species-specific system and with the endogenous control system. Normalization was carried out on fluorescence results obtained for each mixture with the seven species-specific systems and with the endogenous control; these data were used as the calibration curve for further statistical studies. Results of the efficiency of the PCR approach for raw experimental binary

Table 2. Specificity of quail, pheasant, partridge, guinea fowl, pigeon, Eurasian woodcock and song thrush real-time PCR systems ( $C_p$  values obtained from 5 ng DNA).

Species	Quail specific PCR system	Pheasant specific PCR system	Partridge specific PCR system	Guinea fowl specific PCR system	Pigeon specific PCR system	E. woodcock specific PCR system	S. thrush specific PCR system
Quail ( <i>Coturnix coturnix</i> )	20.39 ± 0.19	35	35	35	35	35	35
Pheasant ( <i>Phasianus colchicus</i> )	35	17.01 ± 0.04	35	35	35	35	35
Red-legged partridge ( <i>Alectoris rufa</i> )	35	35	19.14 ± 0.06	35	35	35	35
Chukar partridge ( <i>Alectoris chukar</i> )	35	35	19.23 ± 0.08	35	35	35	35
Barbary partridge ( <i>Alectoris barbara</i> )	35	35	19.19 ± 0.10	35	35	35	35
Guinea fowl ( <i>Numida meleagris</i> )	35	35	35	16.15 ± 0.04	35	35	35
Common pigeon ( <i>Columba livia</i> )	35	35	35	35	16.32 ± 0.07	35	35
Woodpigeon ( <i>Columba palumbus</i> )	35	35	35	35	16.40 ± 0.04	35	35
Eurasian woodcock ( <i>Scolopax rusticola</i> )	35	35	35	35	35	18.22 ± 0.06	35
Song thrush ( <i>Turdus philomelos</i> )	35	35	35	35	35	35	16.03 ± 0.08
Capercaillie ( <i>Tetrao urogallus</i> )	35	35	35	35	35	35	35
Chicken ( <i>Gallus gallus</i> )	35	35	35	35	35	35	35
Turkey ( <i>Meleagris gallopavo</i> )	35	35	35	35	35	35	35
Muscovy duck ( <i>Cairina moschata</i> )	35	35	35	35	35	35	35
Goose ( <i>Anser anser</i> )	35	35	35	35	35	35	35
Cattle ( <i>Bos taurus</i> )	35	35	35	35	35	35	35
Sheep ( <i>Ovis aries</i> )	35	35	35	35	35	35	35
Goat ( <i>Capra hircus</i> )	35	35	35	35	35	35	35
Swine ( <i>Sus scrofa dom.</i> )	35	35	35	35	35	35	35
Fallow deer ( <i>Dama dama</i> )	35	35	35	35	35	35	35
Roe deer ( <i>Capreolus capreolus</i> )	35	35	35	35	35	35	35
Red deer ( <i>Cervus elaphus</i> )	35	35	35	35	35	35	35
Chamois ( <i>Rupicapra rupicapra</i> )	35	35	35	35	35	35	35
Mouflon ( <i>Ovis ammon</i> )	35	35	35	35	35	35	35
Pyrenean ibex ( <i>Capra pyrenaica</i> )	35	35	35	35	35	35	35

Notes: Average  $C_p$  value ± SD shown from duplicate reactions.  $C_p$  of 35 indicates no amplification after 35 cycles.

mixtures are shown in Figures 1 and 2. The slope of log input amount versus  $\Delta C_p$  has a value of  $-3.04$  for the quail-specific system (Figure 1a),  $-3.26$  for pheasant-specific system (Figure 1b),  $-3.09$  for partridge-specific system (Figure 1c),  $-3.11$  for guinea fowl-specific system (Figure 1d),  $-3.00$  for pigeon-specific system (Figure 2a),  $-3.83$  for Eurasian woodcock-specific system (Figure 2b), and  $-3.16$  for song thrush-specific system (Figure 2c), near to the slope's value of  $-3.32$  corresponding to a 100% PCR efficiency. Similarly, Figures 3 and 4 show the results obtained after analyzing the sterilized experimental mixtures.

The theoretical detection limit for each species-specific PCR system was also calculated from the standard curves obtained with the experimental binary mixtures shown in Figures 1–4. The detection limit for each species-specific system was estimated from the corresponding curve as the DNA amount yielding a  $C_p$  value of 35. This value was  $8.4 \times 10^{-5}$  ng in quail,  $1.62 \times 10^{-5}$  ng in pheasant,  $2.08 \times 10^{-5}$  ng in partridge,  $4.2 \times 10^{-6}$  ng in guinea fowl,  $1.36 \times 10^{-5}$  ng in pigeon,  $6.7 \times 10^{-5}$  ng in Eurasian woodcock, and  $3.34 \times 10^{-6}$  ng in song thrush. On the other hand, in sterilized

binary mixtures, the detection limits for DNA from quail, pheasant, partridge, guinea fowl, pigeon, Eurasian woodcock and song thrush specific PCR systems were  $1.3 \times 10^{-3}$  ng,  $6.45 \times 10^{-5}$  ng,  $4.08 \times 10^{-4}$  ng,  $3.68 \times 10^{-5}$  ng,  $1.21 \times 10^{-5}$  ng,  $5.38 \times 10^{-4}$  ng and  $3.2 \times 10^{-5}$  ng, respectively. It should be noted that although sterilization ( $121^\circ\text{C}$  for 20 min) reduces the amount of detectable DNA, positive signals were also observed in thermally treated samples containing small percentages of the target species DNA. It is widely reported that the intensity of the heating and pressure of food-processing treatments, such as sterilization, clearly affects DNA fragmentation and can lead to false-negative results (Hird et al. 2006). In the present work, the length of the amplified DNA fragments minimized sensitivity to degraded DNA templates.

It can be deduced from the results that our real-time PCR method allows quantification of minute amounts of DNA as long as the reference sample used has received the same treatment as the samples analyzed. So, owing to variations found in the amount and quality of amplifiable DNA in our real-time PCR assay, different calibration curves



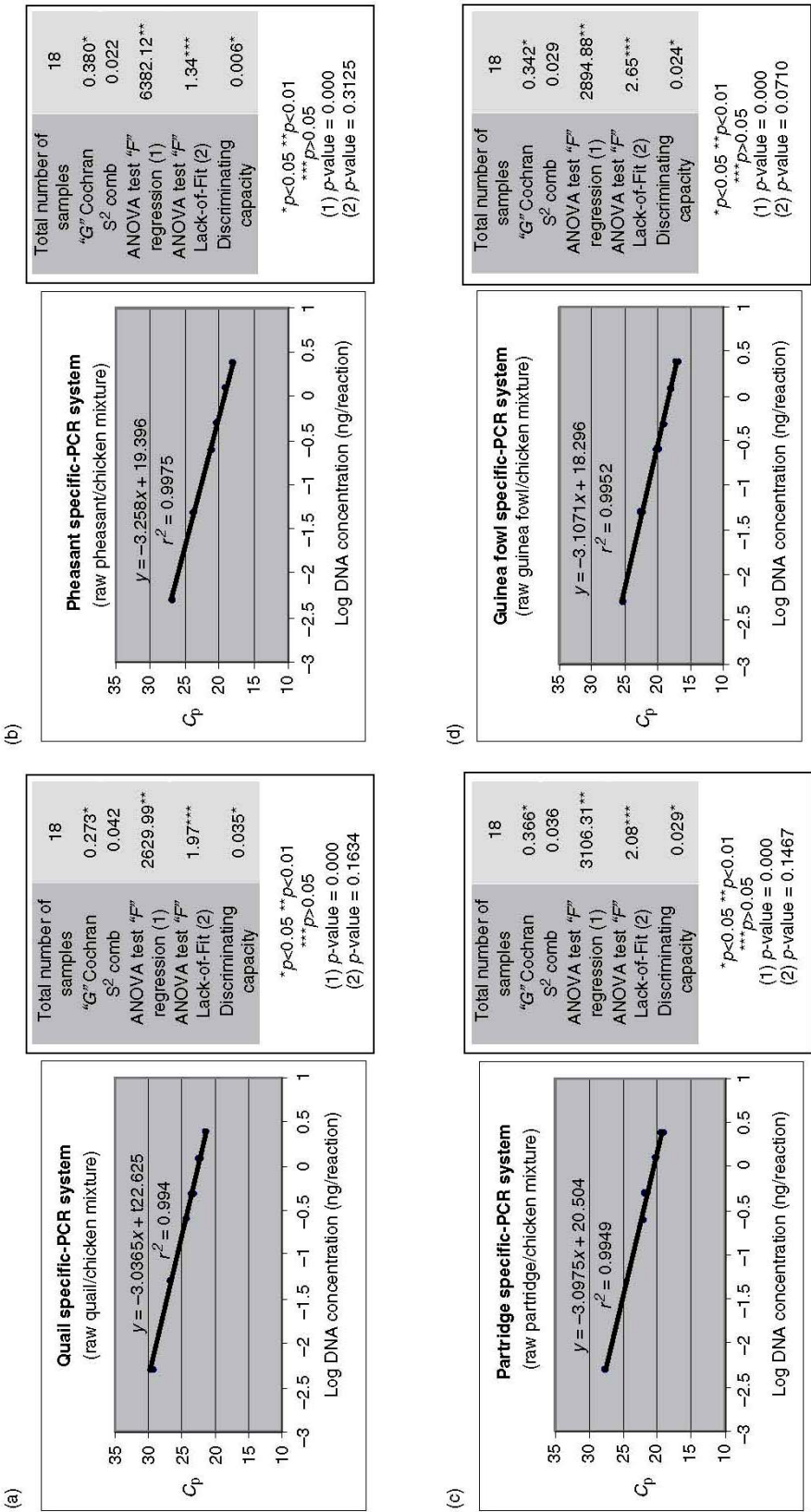


Figure 1. Normalized  $C_p$  values obtained from raw meat mixtures of quail (1a), partridge (1b), pheasant (1c) and guinea fowl (1d) in chicken, plotted versus the logarithm of the DNA concentrations. Linearity test, regression line and sensitivity parameters are calculated for each species-specific PCR system. Three different DNA extractions performed on different percentages of quail, pheasant, partridge or guinea fowl (50, 25, 10, 5, 1 and 0.1%) species in the raw meat mixtures were used as standards.

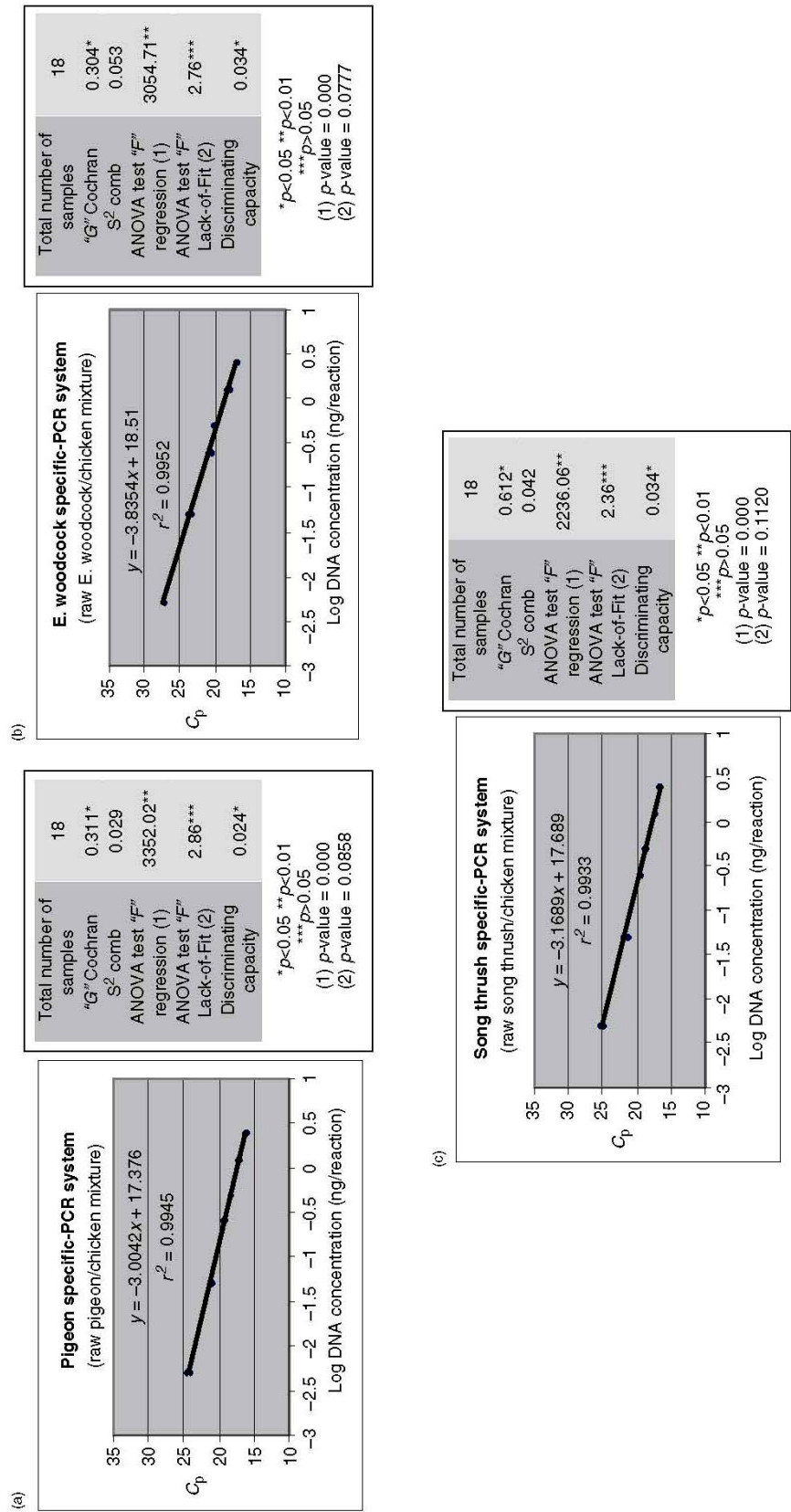


Figure 2. Normalized  $C_p$  values obtained from raw meat mixtures of pigeon (2a), Eurasian woodcock (2b) and song thrush (2c) in chicken, plotted versus the logarithm of the DNA concentrations. Linearity test, regression line and sensitivity parameters are calculated for each species-specific PCR system. Three different DNA extractions performed on different percentages of pigeon, Eurasian woodcock or song thrush (50, 25, 10, 5, 1 and 0.1 %) species in the raw meat mixtures were used as standards.

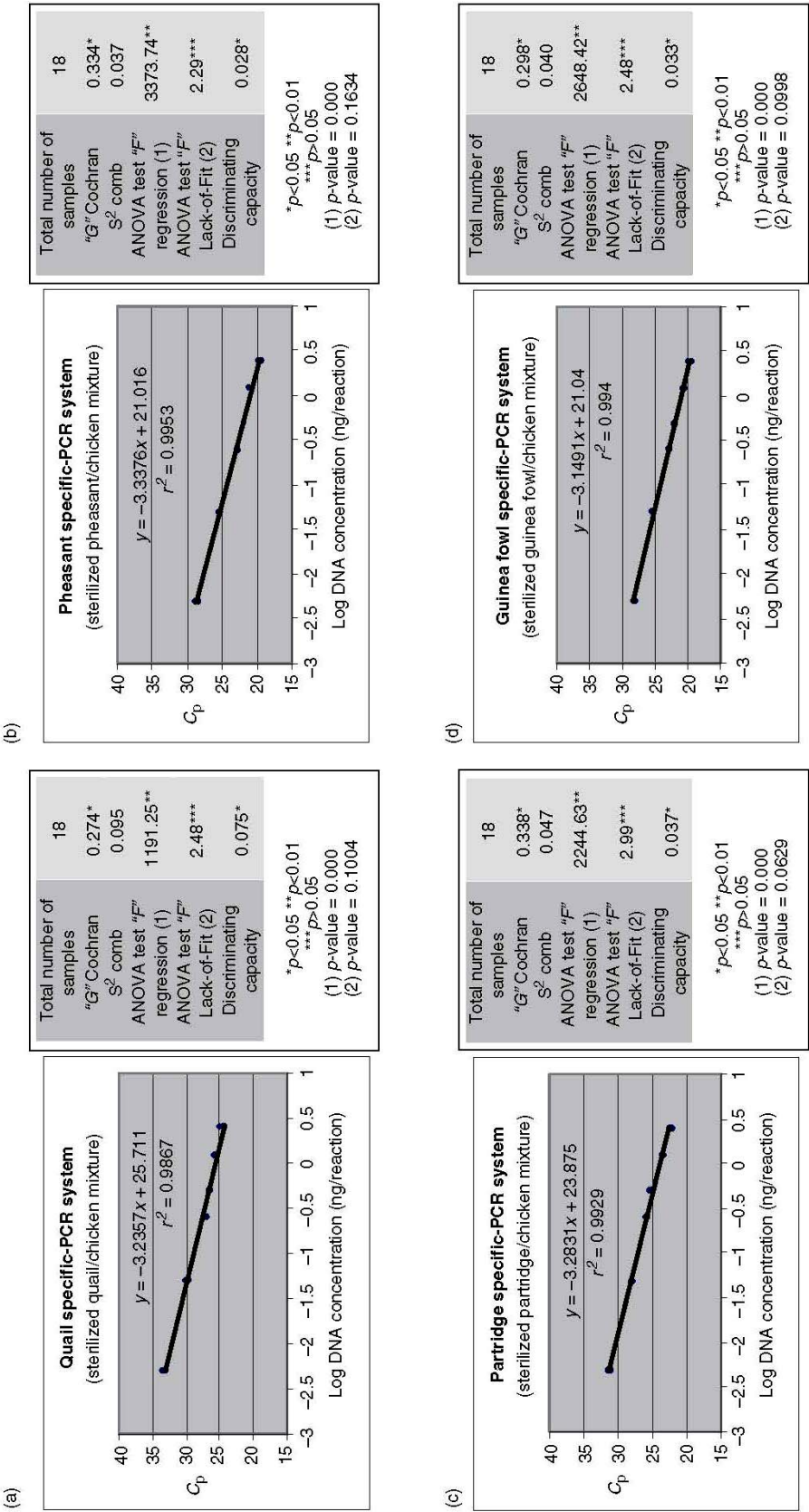


Figure 3. Normalized  $C_p$  values obtained from sterilized meat mixtures of quail (3a), pheasant (3b), partridge (3c) and guinea fowl (3d) in chicken, plotted versus the logarithm of the DNA concentrations. Linearity test, regression line and sensitivity parameters are calculated for each species-specific PCR system. Three different DNA extractions performed on different percentages of quail, pheasant, partridge or guinea fowl (50, 25, 10, 5, 1 and 0.1%) species in the sterilized meat mixtures were used as standards.



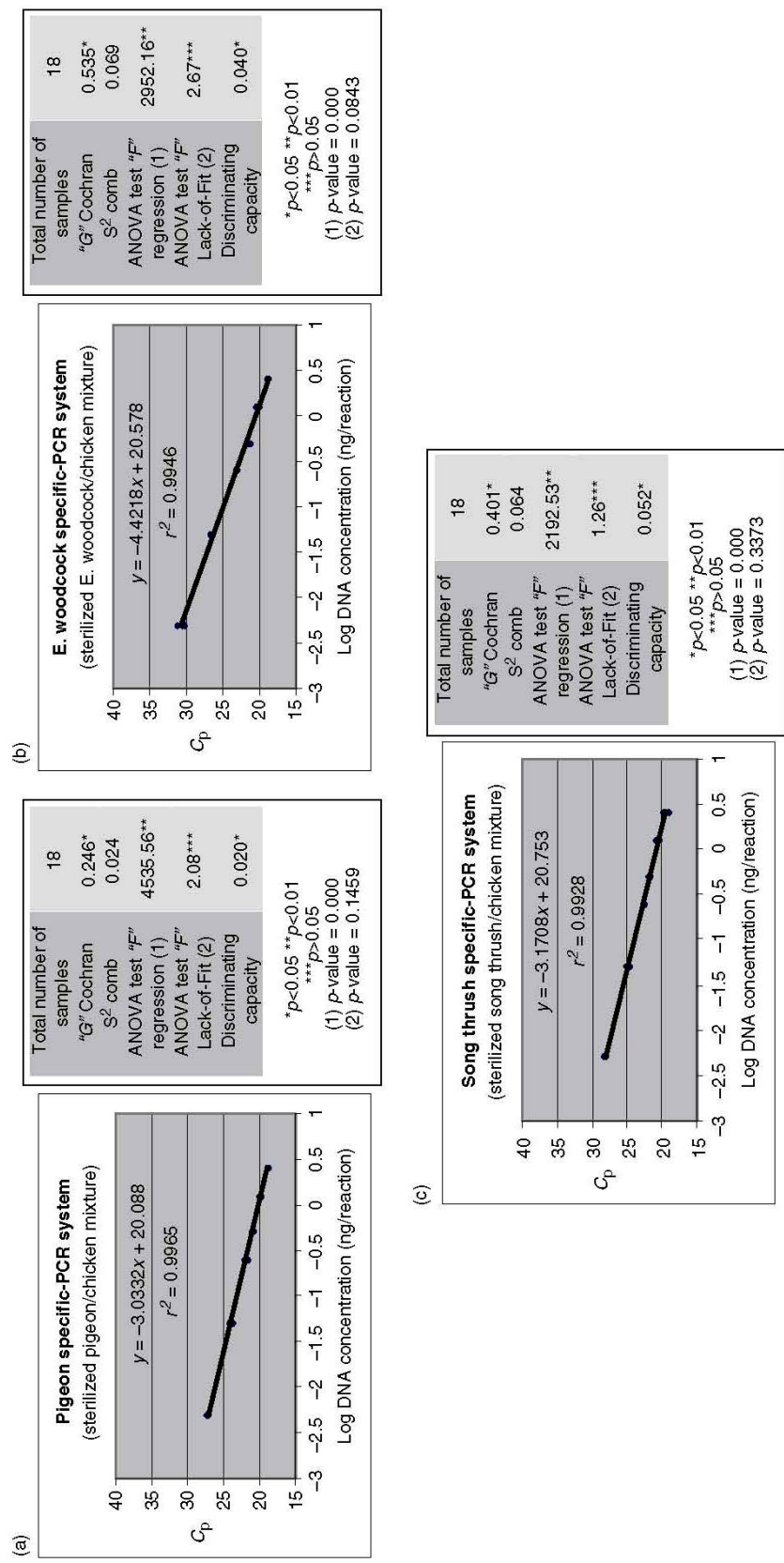


Figure 4. Normalized  $C_p$  values obtained from sterilized meat mixtures of pigeon (4a), Eurasian woodcock (4b) and song thrush (4c) in chicken, plotted versus the logarithm of the DNA concentrations. Linearity test, regression line and sensitivity parameters are calculated for each species-specific PCR system. Three different DNA extractions performed on different percentages of pigeon, Eurasian woodcock or song thrush (50, 25, 10, 5, 1 and 0.1%) species in the sterilized meat mixtures were used as standards.

should be used in accordance with the target species, the tissue matrix and the heat treatment applied to achieve reliable quantification of target meat content.

#### *Sensitivity and linearity*

Normalized  $C_p$  values obtained from the raw and heat-treated meat mixtures of quail, pheasant, partridge, guinea fowl, pigeon, Eurasian woodcock and song thrush in chicken, versus the logarithm of the DNA concentrations, were used to test the sensitivity of the real-time PCR method. Figures 1–4 show the discriminating capacity, which is the least difference in logarithm of target DNA concentration in the mixture that the analytical method can discriminate with a significant level. Linearity of the quail, pheasant, partridge, guinea fowl, pigeon, Eurasian woodcock and song thrush real-time PCR response was also analyzed for each experimental raw and heat-treated binary mixture. In each case, the following parameters were evaluated: (a) Cochran's test, which determined whether the variances of the responses obtained for each concentration of quail, pheasant, partridge, guinea fowl, pigeon, Eurasian woodcock or song thrush DNA in the mixtures (raw and heat-treated) were homogeneous, (b) regression analysis, and (c) variance analysis with lack-of-fit. The results are also summarized in Figures 1–4.

#### *Accuracy and precision*

The accuracy of the assay was determined from three meat percentages (25, 10 and 1%) of each raw and heat-treated binary mixture. Accuracy is reported as percentage recovery by the assay of known added amounts of analyte. Using the Snedecor  $F$ -test, it was verified that the concentration of DNA present in a sample did not affect the variation of the results. The values for the Student's  $t$ -test obtained demonstrated that the method was accurate, since no significant differences between 100% and the mean recovery values were detected.

The influence of day of analysis on the precision of the assay was also tested by comparing the coefficients of variation (CV) of three separate DNA extractions performed on the 1% raw and sterilized binary mixtures, analyzed in duplicate three times on the same day, versus the values obtained for the same samples on three different days. Results showed significant differences with higher CV values when the assay was done on different days with respect to the same day. This could be ascribed to the fact that different master mix vials were used in the assays performed on different days and it could be also attributed to minimal volumetric variations caused by pipetting errors in any of the steps of the real-time

PCR experiment (DNA aliquot preparation, mix of reagents, dispensation of the master mix into the PCR capillaries, etc.). Thus, for the quantification of quail, pheasant, partridge, guinea fowl, pigeon, Eurasian woodcock and song thrush DNAs, a standard curve should be determined on each day of analysis.

#### *Application of the assay to commercial meat products*

The method was also tested with regard to its suitability for detection of game bird DNA in commercial meat products. For this purpose, DNA samples extracted from quail, pheasant, partridge, guinea fowl, pigeon, Eurasian woodcock and song thrush meat products were analyzed. As can be seen in Tables 3 and 4, the specific and endogenous  $C_p$  values obtained from the DNA samples extracted from these commercial products were very variable, including those obtained in different pâté samples with similar specified content of the target species (Table 4). This can be attributed to a variation in factors, such as meat quality, tissue type, matrix composition and levels of processing. It should be noted that, in most cases, the results obtained from the analysis of meat products were in agreement with the declaration of quail, pheasant, partridge, guinea fowl, pigeon, Eurasian woodcock or song thrush content on the label. However, seven partridge pâtés and one pheasant pâté, which were supposed to contain partridge and pheasant, respectively, did not produce positive results with the corresponding species-specific real-time PCR systems. Nevertheless, successful results were obtained with the endogenous control system, suggesting a possible fraud in the labeling of these pâté samples (Table 4). In addition, commercial meat samples containing more than one species in their composition were also tested for the presence of other animal species stated in the label, such as chicken, turkey, cattle, swine and duck. For this purpose, conventional PCR assays using species-specific primers for the mentioned species were carried out. In all the samples tested, the results obtained were in accordance with the species composition stated on the labels, including the pâté samples in which partridge and pheasant were not detected (Table 4).

To test the usefulness of the method for the quantification of the target species in commercial meat products containing more than one species in their composition, a quantitative measurement was performed substituting the normalized  $C_p$  values obtained for these products in the standard equations derived from the analysis of the experimental sterilized binary mixtures. As can be seen in Table 4, the results obtained indicated a complete disagreement between the amounts detected and the declared content of each target species. Although, as previously described, this

Table 3.  $C_p$  values obtained for PCR products amplified with species-specific primers from DNA extracted of raw and heat-treated commercial meat products containing only one species in their composition ( $C_p$  values produced using 5 ng DNA).

Type of product	Quail specific PCR system	Pheasant specific PCR system	Partridge specific PCR system	Guinea fowl specific PCR system	Pigeon specific PCR system	E. woodcock specific PCR system	Song thrush specific PCR system	Endogenous control PCR system
Quail pickled thighs A	23.81 ± 0.13	35	35	35	35	35	35	23.14 ± 0.13
Quail pickled thighs B	23.14 ± 0.08	35	35	35	35	35	35	21.56 ± 0.08
Quail pickled meat	24.43 ± 0.09	35	35	35	35	35	35	20.52 ± 0.13
Quail boned pickled meat	20.94 ± 0.18	35	35	35	35	35	35	21.48 ± 0.18
Quail braised meat	20.80 ± 0.21	35	35	35	35	35	35	20.27 ± 0.21
Pheasant braised meat A	35	23.52 ± 0.08	35	35	35	35	35	22.38 ± 0.14
Pheasant braised meat B	35	21.86 ± 0.11	35	35	35	35	35	22.07 ± 0.21
Pheasant ragout	35	24.45 ± 0.23	35	35	35	35	35	23.19 ± 0.13
Partridge pickled thighs A	35	35	24.66 ± 0.27	35	35	35	35	22.48 ± 0.26
Partridge pickled meat A	35	35	20.61 ± 0.21	35	35	35	35	23.50 ± 0.22
Partridge pickled meat B	35	35	25.89 ± 0.14	35	35	35	35	24.04 ± 0.17
Partridge pickled meat C	35	35	28.54 ± 0.07	35	35	35	35	25.02 ± 0.13
Partridge pickled meat D	35	35	24.58 ± 0.21	35	35	35	35	24.28 ± 0.18
Partridge pickled meat E	35	35	27.85 ± 0.11	35	35	35	35	25.30 ± 0.21
Partridge pickled meat F	35	35	25.22 ± 0.16	35	35	35	35	23.25 ± 0.22
Partridge boned pickled meat A	35	35	28.61 ± 0.06	35	35	35	35	25.34 ± 0.17
Partridge boned pickled meat B	35	35	27.36 ± 0.21	35	35	35	35	24.35 ± 0.11
Partridge stewed meat	35	35	19.67 ± 0.11	35	35	35	35	18.02 ± 0.23
Partridge braised meat A	35	35	24.22 ± 0.13	35	35	35	35	22.35 ± 0.17
Partridge braised meat B	35	35	25.72 ± 0.16	35	35	35	35	24.74 ± 0.17
G. fowl braised meat A	35	35	35	19.09 ± 0.17	35	35	35	19.48 ± 0.19
G. fowl braised meat B	35	35	35	19.97 ± 0.24	35	35	35	20.14 ± 0.24
G. fowl stewed meat	35	35	35	21.48 ± 0.11	35	35	35	22.85 ± 0.17
Pigeon pickled thighs	35	35	35	35	26.13 ± 0.32	35	35	24.76 ± 0.18
Pigeon pickled meat A	35	35	35	35	25.80 ± 0.15	35	35	22.29 ± 0.12
Pigeon pickled meat B	35	35	35	35	24.87 ± 0.05	35	35	24.14 ± 0.37
Pigeon braised meat	35	35	35	35	26.43 ± 0.22	35	35	20.76 ± 0.23
E. woodcock refrigerated meat A	35	35	35	35	35	18.25 ± 0.32	35	21.85 ± 0.14
E. woodcock refrigerated meat B	35	35	35	35	35	18.06 ± 0.12	35	21.94 ± 0.05
E. woodcock frozen meat	35	35	35	35	35	18.41 ± 0.14	35	22.09 ± 0.28
S. thrush refrigerated meat A	35	35	35	35	35	35	16.03 ± 0.25	19.54 ± 0.16
S. thrush refrigerated meat B	35	35	35	35	35	35	15.81 ± 0.08	19.40 ± 0.11

Notes: Average  $C_p$  value ± SD shown from duplicate reactions.  
 $C_p$  of 35 indicates no amplification.

Table 4.  $C_p$  values obtained for PCR products amplified with species-specific primers from DNA extracted of commercial meat products containing more than one species in their composition ( $C_p$  values produced using 5 ng DNA).

Type of product	Quail specific PCR system	Pheasant specific PCR system	Partridge specific PCR system	Guinea fowl specific PCR system	Pigeon specific PCR system	Endogenous control PCR system	Declared content of the target species	Estimated content of the target species	Other species detected according to the label description
Quail pâté A	26.56 ± 0.07	35	35	35	35	25.01 ± 0.07	40%	79%	Cattle, swine, chicken, duck
Quail pâté B	23.37 ± 0.17	35	35	35	35	22.11 ± 0.07	30%	85%	Cattle, swine, chicken
Quail pâté C	25.08 ± 0.12	35	35	35	35	20.77 ± 0.17	11%	8%	Cattle, swine, chicken, turkey
Quail pâté C	21.62 ± 0.15	35	35	35	35	20.23 ± 0.22	30%	71%	Cattle, swine, chicken
Pheasant pâté A	35	19.75 ± 0.08	35	35	35	18.62 ± 0.27	20%	4%	Cattle, swine, chicken
Pheasant pâté B	35	21.48 ± 0.03	35	35	35	20.73 ± 0.18	25%	5.5%	Swine, turkey
Pheasant pâté C	35	22.63 ± 0.08	35	35	35	24.07 ± 0.11	25%	24%	Cattle, swine, chicken, turkey
Pheasant pâté D	35	24.98 ± 0.23	35	35	35	23.07 ± 0.11	25%	3%	Cattle, swine, chicken, duck
Pheasant pâté E	35	21.45 ± 0.12	35	35	35	21.06 ± 0.12	25%	7%	Cattle, swine, chicken, turkey
Pheasant pâté F	35	35	35	35	35	23.21 ± 0.24	32%	Not detected	Cattle, swine, chicken, turkey
Pheasant pâté G	35	28.01 ± 0.15	35	35	35	22.34 ± 0.12	2%	0.2%	Cattle, swine, chicken, turkey
Pheasant pâté H	35	21.66 ± 0.14	35	35	35	21.35 ± 0.09	25%	8%	Cattle, swine, chicken, turkey
Partridge pâté A	35	35	35	35	35	22.05 ± 0.08	30.5%	Not detected	Cattle, swine, chicken
Partridge pâté B	35	35	27.24 ± 0.23	35	35	21.66 ± 0.21	30%	8%	Cattle, swine, duck
Partridge pâté C	35	35	23.55 ± 0.22	35	35	19.58 ± 0.28	— <sup>a</sup>	17%	Cattle, swine
Partridge pâté D	35	35	26.61 ± 0.09	35	35	21.32 ± 0.27	—	9%	Cattle, swine, chicken, turkey
Partridge pâté E	35	35	35	35	35	20.45 ± 0.24	20%	Not detected	Cattle, swine, chicken, duck
Partridge pâté F	35	35	35	35	35	20.68 ± 0.32	20%	Not detected	Cattle, swine, chicken, duck
Partridge pâté G	35	35	24.15 ± 0.09	35	35	21.32 ± 0.07	—	45%	Cattle, swine, chicken, turkey
Partridge pâté H	35	35	26.90 ± 0.12	35	35	18.05 ± 0.15	—	0.3%	Cattle, swine, chicken, duck
Partridge pâté I	35	35	28.34 ± 0.23	35	35	21.55 ± 0.11	—	3.5%	Cattle, swine, chicken
Partridge pâté J	35	35	35	35	35	21.31 ± 0.22	22%	Not detected	Cattle, swine, chicken
Partridge pâté K	35	35	35	35	35	20.45 ± 0.25	25%	Not detected	Cattle, swine, chicken, duck
Partridge pâté L	35	35	28.62 ± 0.24	35	35	21.93 ± 0.13	—	4%	Cattle, swine, chicken, turkey
Partridge pâté M	35	35	24.31 ± 0.13	35	35	21.91 ± 0.31	25%	62%	Cattle, swine, chicken, duck
Partridge pâté N	35	35	35	35	35	20.11 ± 0.21	22%	Not detected	Cattle, swine, chicken
Partridge pâté O	35	35	35	35	35	21.87 ± 0.08	30.5%	Not detected	Cattle, swine, chicken
G. fowl pâté A	35	35	35	24.42 ± 0.21	35	23.14 ± 0.14	34%	1%	Swine, chicken, turkey
G. fowl pâté B	35	35	35	25.52 ± 0.08	35	25.56 ± 0.05	20%	2.5%	Swine, duck
G. fowl pâté C	35	35	35	25.12 ± 0.16	35	24.61 ± 0.05	20%	2%	Cattle, chicken, turkey
G. fowl pâté D	35	35	35	22.62 ± 0.23	35	24.02 ± 0.21	34%	7%	Swine, chicken, turkey
Pigeon pâté A	35	35	35	35	20.27 ± 0.13	23.51 ± 0.29	10%	26%	Cattle, swine, chicken, turkey, duck
Pigeon pâté B	35	35	35	35	20.45 ± 0.21	23.08 ± 0.15	10%	17%	Cattle, swine, chicken, turkey, duck
Pigeon pâté C	35	35	35	35	22.97 ± 0.14	23.20 ± 0.24	—	3%	None
Pigeon pâté D	35	35	35	35	23.24 ± 0.16	22.98 ± 0.12	—	2%	None

is a technique with quantitative potential, the use of the standard equations developed in this work is not suitable for the quantification of commercial meat products for two reasons: (1) the composition of the commercial meat products, due to the presence of different ingredients, could influence the real-time reaction, and (2) it was not possible to know if the heat-treatment applied to each product was similar to the sterilization treatment used in the present work (121°C, 20 min). As a consequence, the  $C_p$  values measured on commercial meat products can only be used for a quantitative estimate of the target species content if samples identical in composition and processing treatment to the analyzed products are available for the preparation of appropriate calibration standards. Taking into account the great variety of ingredients used in the preparation of commercial meat products (meat, liver, fat, oil, milk, butter, vegetables, etc.) as well as the diversity of heat treatments applied by the meat industry, the preparation of calibration standards for each type of product is not feasible. Therefore, the use of our real-time PCR technique for the analysis of commercial meat products is limited to qualitative detection of the target species. Nevertheless, it should be noted that quail, pheasant, partridge, guinea fowl, pigeon, Eurasian woodcock and song thrush qualitative detection in commercial meat products was not hindered by the heat and pressure processing of autoclaving, oven cooking, pickling, or by the presence of other meats, indicating the suitability of the assays for the testing of complex commercial food products (Chisholm et al. 2008).

In conclusion, TaqMan real-time polymerase chain reaction is a powerful tool that is simple and relatively fast, with good sensitivity and specificity. The potential of the described procedure to detect small amounts of quail, pheasant, partridge, guinea fowl, pigeon, Eurasian woodcock and song thrush DNA in raw and heat-treated meats make it a useful tool for inspection programs to enforce labeling regulations for game bird meat products.

#### Acknowledgements

This study was supported by Grant No. AGL 2007-60077 from the Ministerio de Educación y Ciencia of Spain and the Programa de Vigilancia Sanitaria S-0505/AGR/000265 from the Comunidad de Madrid (Spain). María Rojas and Miguel Ángel Pavón are recipients of a fellowship from the Ministerio de Ciencia e Innovación (Spain). Nicolette Pegels is recipient of a fellowship from the Comunidad de Madrid (Spain). We are indebted to Dr Santiago Lavín González (Facultad de Veterinaria, Universidad Autónoma de Barcelona), Dr Juan José Negro Balmaseda (Estación Biológica de Doñana, Sevilla), and Dra Susana Dunner (Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid) for kindly supplying capercaillie, red-legged partridge, and barbara partridge samples.

#### References

- Camacho MA, Torres AI, Gil-Alegre ME, Obregón MM, Ruz V. 1993. Validation protocol of analytical methods for finished pharmaceutical products. *STP Pharm Pract.* 3:197–202.
- Caporale V, Giovannini A, Di Francesco C, Calistri P. 2001. Importance of the traceability of animals and animal products in epidemiology. *Rev Sci Tech Off Int Epiz.* 20:372–378.
- Che Man YB, Aida AA, Raha AR, Son R. 2007. Identification of pork derivatives in food products by species-specific polymerase chain reaction (PCR) for halaI verification. *Food Control.* 18:885–889.
- Chisholm J, Conyers C, Booth C, Lawley W, Hird H. 2005. The detection of horse and donkey using real-time PCR. *Meat Sci.* 70:727–732.
- Chisholm J, Sánchez A, Brown J, Hird H. 2008. The development of species-specific real-time PCR assays for the detection of pheasant and quail in food. *Food Anal Methods.* 1:190–194.
- Di Pinto A, Forte VT, Conversano MC, Tantillo GM. 2005. Duplex polymerase chain reaction for detection of pork meat in horse meat fresh sausages from Italian retail sources. *Food Control.* 16:391–394.
- Dooley JJ, Paine KE, Garrett SD, Brown HM. 2004. Detection of meat species using TaqMan real-time PCR assays. *Meat Sci.* 68:431–438.
- Fajardo V, González I, Martín I, López-Calleja I, Rojas M, Hernández PE, García T, Martín R. 2007. PCR identification of meats from chamois (*Rupicapra rupicapra*), pyrenean ibex (*Capra pyrenaica*), and mouflon (*Ovis ammon*) targeting specific sequences from the mitochondrial D-loop region. *Meat Sci.* 76:644–652.
- Fajardo V, González I, Martín I, Rojas M, Hernández PE, García T, Martín R. 2008a. Real-time PCR for detection and quantification of red deer (*Cervus elaphus*), fallow deer (*Dama dama*), and roe deer (*Capreolus capreolus*) in meat mixtures. *Meat Sci.* 79:289–298.
- Girish PS, Anjaneyulu ASR, Viswas KN, Anand M, Rajkumar N, Shivakumar BM, Sharma B. 2004. Sequence analysis of mitochondrial 12S rRNA gene can identify meat species. *Meat Sci.* 66:551–556.
- Hird H, Chisholm J, Sánchez A, Hernández M, Goodier R, Schneede K. 2006. Effect of heat and pressure processing on DNA fragmentation and implications for the detection of meat using a real-time polymerase chain reaction. *Food Addit Contam.* 23:645–650.
- ICH Harmonised Tripartite Guideline 2005. Validation of analytical procedures: text and methodology Q2 (R1). Available at: <http://drugtiger.com/d/gdoc/media417.pdf>
- Kesmen Z, Sahin F, Yetim H. 2007. PCR assay for the identification of animal species in cooked sausages. *Meat Sci.* 77:649–653.
- Martín I, García T, Fajardo V, López-Calleja I, Rojas M, Hernández PE, González I, Martín R. 2007a. Mitochondrial markers for the detection of four duck species and the specific identification of Muscovy duck in meat mixtures using the polymerase chain reaction. *Meat Sci.* 76:721–729.
- Martín I, García T, Fajardo V, López-Calleja I, Hernández PE, González I, Martín R. 2007b. Species-

- specific PCR for the identification of ruminant species in feedstuffs. *Meat Sci.* 75:120–127.
- Martín I, García T, Fajardo V, López-Calleja I, Rojas M, Pavón MA, Hernández PE, González I, Martín R. 2007c. Detection of chicken, turkey, duck, and goose tissues in feedstuffs, using species-specific polymerase chain reaction. *J Anim Sci.* 85:452–458.
- Martín I, García T, Fajardo V, Rojas M, Pegels N, Hernández PE, González I, Martín R. 2008. SYBR-Green real-time PCR approach for the detection and quantification of pig DNA in feedstuffs. *Meat Sci.* 82:252–259.
- Rodríguez MA, García T, González I, Asensio L, Hernández PE, Martín R. 2004. Quantitation of mule duck in goose foie gras using TaqMan real-time polymerase chain reaction. *J Agric Food Chem.* 52:1478–1483.
- Rojas M, González I, Fajardo V, Martín I, Hernández PE, García T, Martín R. 2008. Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism authentication of raw meats from game birds. *J AOAC Int.* 91:1416–1422.
- Rojas M, González I, Fajardo V, Martín I, Hernández PE, García T, Martín R. 2009. Authentication of meats from quail (*Coturnix coturnix*), pheasant (*Phasianus colchicus*), partridge (*Alectoris* spp.), and guinea fowl (*Numida meleagris*) using polymerase chain reaction targeting specific sequences from the mitochondrial 12S rRNA gene. *Food Control.* 20:896–902.
- Tanabe S, Hase M, Yano T, Sato M, Fujimura T, Akiyama H. 2007. A real-time quantitative PCR detection method for pork, chicken, beef, mutton, and horseflesh in foods. *Biosci Biotechnol Biochem.* 71:3131–3135.
- Teletchea F, Maudet C, Hänni C. 2005. Food and forensic molecular identification: Update and challenges. *Trends Biotechnol.* 23:359–366.
- Verbeke W, Ward RW. 2006. Consumer interest in information cues denoting quality, traceability and origin: an application of ordered probit models to beef labels. *Food Qual Prefer.* 17:453–467.
- Woolfe M, Primrose S. 2004. Food forensics: using DNA technology to combat misdescription and fraud. *Trends Biotechnol.* 22:222–226.
- Zhang C, Fowler MR, Scott NW, Lawson G, Slater A. 2007. A TaqMan real-time PCR system for the identification and quantification of bovine DNA in meats, milks and cheeses. *Food Control.* 18:1149–1158.







Contents lists available at ScienceDirect

## Food Control

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/foodcont](http://www.elsevier.com/locate/foodcont)

## Application of a real-time PCR assay for the detection of ostrich (*Struthio camelus*) mislabelling in meat products from the retail market

María Rojas, Isabel González, Miguel Ángel Pavón, Nicolette Pegels, Pablo E. Hernández, Teresa García, Rosario Martín\*

Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 23 March 2010

Received in revised form

23 September 2010

Accepted 29 September 2010

## Keywords:

Ostrich meat

12S rRNA gene

Real-time PCR

## ABSTRACT

A rapid and highly species-specific real-time polymerase chain reaction (PCR) assay has been developed for the authentication of ostrich meat (*Struthio camelus*). The method combines the use of ostrich-specific primers, that amplify a 155 bp fragment of the mitochondrial 12S rRNA gene, and a positive control primer pair that amplifies a 141 bp fragment of the nuclear 18S rRNA gene from eukaryotic DNA. SYBR® Green dye or TaqMan® fluorogenic probes were used to monitor the amplification of the target genes. Results obtained with the use of TaqMan® probes as detection platform increased the specificity of the real-time PCR assay in comparison with the results obtained using SYBR® Green. Analysis of 100 commercial ostrich meat products from the market demonstrated the suitability of the technique for the detection of ostrich DNA. The results obtained suggest that this method may be routinely applied to verify the correct labelling of ostrich meat products.

© 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

Recent food scares and inappropriate risk management practices have increased consumer's awareness regarding the origin and composition of the food products they purchase. In this context, the identification of animal species in meat products has been gaining in practical importance as a tool to avoid unfair competition and to assure accurate and truthful labelling. The ability to authenticate food products is also of mayor concern to the food industry since manufacturers must be able to confirm the authenticity of components of their products in order to comply with government legislation (Calvo, Zaragoza, & Osta, 2001; Sun, 2008). Furthermore, the identification of the species origin of meat is a valuable tool for the assessment of risk associated with introduction of animal material that might be harmful to human or animal health (Corona, Leonard, Carpio, Uffo, & Martínez, 2007).

A particular type of product susceptible for fraudulent labelling is ostrich meat. In the last few years, the consumption of ostrich meat and derived products has increased significantly in many parts of the world. This increase has been driven, in part, due to the consumer demand for low-fat and healthy meat products. Meat from ostrich has high levels of polyunsaturated fatty acids, low

intramuscular fat content, fine texture, and delicate flavour when prepared properly (Fisher, Hoffman, & Mellet, 2000; McKenna et al., 2003). On the other hand, ostrich meat has also become of great importance as a consequence of the recent spread of food diseases (e.g. BSE, foot-and-mouth disease, etc.) which have propelled the search by the consumer for alternative red meat sources (Abdulmawjood & Bülte, 2002). The steadily growing demand for ostrich meat and meat products as well as the high prices that consumers are ready to pay for them could lead to fraudulent practices of ostrich meat substitution. Therefore, it is necessary to develop and apply rapid and accurate methods for the identification of inappropriately labelled ostrich meat products.

Different analytical methods have been used to identify the species of origin of meat products. Among these, DNA-based techniques have become increasingly popular and are widely used nowadays (Alves, Castellanos, Ovilo, Silió, & Rodríguez, 2002). DNA has the advantage of being a relatively stable molecule, is more able to withstand heat and pressure processing, and its sequence is conserved within all tissues of an individual (Lanzilao, Burgalassi, Fancelli, Settimelli, & Fani, 2005). Among DNA-based methods, polymerase chain reaction (PCR) coupled with techniques such as nucleotide sequencing (Girish et al., 2004), random amplified polymorphic DNA (RAPD) (Arslan, Ilhak, Calicioglu, & Karahan, 2005; Huang, Horng, Huang, Sin, & Chen, 2003), restriction fragment length polymorphism (RFLP) (Murugaiah et al., 2009; Rojas et al., 2008, 2009a; Stamoulis, Stamatis, Sarafidou, & Mamuris,

\* Corresponding author. Tel.: +34 913943752; fax: +34 913943743.

E-mail address: [rmartins@vet.ucm.es](mailto:rmartins@vet.ucm.es) (R. Martín).



2010) or PCR with species-specific primers (Bai et al., 2009; Mane, Mendiratta, & Tiwari, 2009; Rojas et al., 2009b), have been extensively applied for the detection of animal species in a wide range of raw and processed foods. Recently, with the emergence of real-time PCR technology, several PCR methods based on the use of SYBR® Green or Taqman® probes, have been also reported for meat species identification (Chisholm, Sánchez, Brown, & Hird, 2008; Köppel, Zimmerli, & Breitenmoser, 2009; López-Andreo, Lugo, Garrido-Pertierra, Prieto, & Puyet, 2005; Tanabe et al., 2007). Real-time PCR combines PCR chemistry with the ability to detect and continuously monitor the accumulation of reaction products after each amplification cycle (Houghton & Cockerill, 2006).

In this work we describe the development of a real-time PCR assay for the authentication of ostrich meat (*Struthio camelus*) using two types of fluorescent reagents as detection platform: the non-specific fluorescent dye SYBR® Green and species-specific TaqMan® probes. The assay targets a species-specific sequence on the 12S rRNA gene and makes use of an eukaryotic system based on an 18S rRNA fragment as positive control.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Selection of meat samples and DNA extraction

Authentic muscle samples of ostrich (*S. camelus*), pheasant (*Phasianus colchicus*), and guinea fowl (*Numida meleagris*), were provided by Antonio de Miguel (Madrid, Spain). Chicken (*Gallus gallus*), turkey (*Meleagris gallopavo*), Muscovy duck (*Cairina moschata*), goose (*Anser anser*), beef (*Bos taurus*), sheep (*Ovis aries*), goat (*Capra hircus*), pig (*Sus scrofa domestica*), red-deer (*Cervus elaphus*), fallow-deer (*Dama dama*), and roe-deer (*Capreolus capreolus*) meat samples were obtained from several Spanish abattoirs and meat-cutting installations. All specimens were morphologically identified by professional veterinaries before obtaining the samples.

Fresh muscle portions from the selected specimens were processed immediately or stored frozen at  $-20^{\circ}\text{C}$  until use. Ostrich meat was also analyzed after being subjected to experimental pasteurization ( $72^{\circ}\text{C}$  for 30 min) and sterilization ( $121^{\circ}\text{C}$  for 20 min) treatments.

Binary mixtures containing 0.1%, 1%, 5%, 10%, and 25%, (wt/wt) of ostrich meat in chicken meat were prepared with a blender (Sunbeam Oster, Delray Beach, FL) to a final weight of 100 g. Fifty grams of each mixture was sterilized at  $121^{\circ}\text{C}$  for 20 min.

In addition, 100 commercial meat products labelled as ostrich, including raw steaks, raw sirloins, raw hamburgers, dry-cured sausages, smoked meats, braised meats, and pâtés of several brands, were purchased from different retail markets (Spain).

Total DNA was extracted from meat following a previously described method (Rojas et al., 2008). DNA concentration was measured with a NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop Technologies Inc., Montchanin, DE). DNA concentration values obtained ranged from 300 to 1000 ng/ $\mu\text{L}$  depending on the sample, with A260/A280 ratios between 1.7 and 1.9, which indicated good DNA purity.

### 2.2. Primers and probes design

12S-FW and 12S-REV oligonucleotides designed by Fajardo et al. (2006) were used for the amplification, purification and sequencing of an approximately 720 bp conserved fragment of the 12S rRNA gene from ostrich following the procedure described by Rojas et al. (2008). The nucleotide sequence obtained from ostrich 12S rRNA gene (FN675552) was aligned and compared with chicken, turkey, Muscovy duck, goose, beef, sheep, goat, and pig 12S rRNA sequences,

obtained previously (Fajardo et al., 2006; Rojas et al., 2008). Based upon detailed analysis and comparison of the aligned 12S rRNA sequences, a primer pair (12SSTH-FW/12SSTH-REV) was designed for the specific amplification of an ostrich-specific 155 bp fragment. Besides, 18SpEUDIR and 18SpEUINV primers based on conserved 18S rRNA gene sequences available in the Genbank/EMBL database for various avian and mammal species were used as positive control of the PCR assay. These primers were expected to amplify a conserved fragment of 141 bp from the 18S rRNA gene in all the analyzed species.

The EMMA program included in the EMBOSS software package version 2.0 and Primer Express 2.0 software (Perkin–Elmer/ Applied Biosystems Division, Foster City, CA, USA) were used for sequence alignment and primer design.

To accomplish the detection procedure in the real-time PCR approach using TaqMan® probes, an ostrich-specific fluorescent hybridization TaqMan® probe (STH-TM) was used. In addition, another TaqMan® probe (18SPROBE) based on conserved 18S rRNA gene sequences available in the Genbank/EMBL database for various avian and mammal species was used as positive control in the real-time PCR system. TaqMan® probes were designed and synthesized by TibMolBiol (Berlin, Germany). The TaqMan® probes were aimed to anneal within the gene fragment generated by amplification of the corresponding target and were labelled on the 5' end with the fluorescent reporter dye 6-carboxyfluorescein (FAM) and on the 3' end with the blackberry (BBQ) fluorescent quencher.

In addition, species-specific primers developed in previous works (Martín, García, Fajardo, López-Calleja, Hernández, et al., 2007; Martín, García, Fajardo, López-Calleja, Rojas, Pavón, et al., 2007; Martín et al., 2008) for chicken, duck, bovine, and pig species were used in conventional PCR assays for the analysis of complex meat products from ostrich in order to verify the composition stated in the labels.

Sequences and description of the primers and probes used in this work are summarized in Table 1.

### 2.3. PCR conditions

Real-time PCR was run under generic cycling conditions. To determine the optimal quantity of primers, preliminary tests were performed using equimolar primer concentrations (50 nM, 300 nM, and 900 nM). The concentrations of primers yielding the highest endpoint fluorescence and the lowest  $C_p$  (data not shown) were 900 nM of specific ostrich forward primer (12SSTH-FW) and 900 nM of reverse primer (12SSTH-REV). The positive control system used 300 nM of forward primer (18SpEUDIR) and 900 nM of reverse primer (18SpEUINV). The PCR reactions were carried out using the LightCycler® Fast Start DNA Master<sup>PLUS</sup> SYBR® Green I (Roche Applied Science, Pensberg, Germany) in the SYBR® Green approach, whereas the LightCycler® TaqMan® Master (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) and 2 pmol of TaqMan® probe (TibMolBiol), were used in the TaqMan® assay. In both cases 5 ng of DNA were used. Amplification reactions were performed in a total reaction volume of 10  $\mu\text{L}$  in a glass capillary tube and were run on the LightCycler® 2.0 Instrument (Roche Applied Science, Pensberg, Germany). For the real-time PCR assay using SYBR® Green as detection platform the following program was used: 10 min at  $95^{\circ}\text{C}$  (denaturation and Taq polymerase activation), an amplification program of 40 cycles at  $95^{\circ}\text{C}$  for 10 s,  $63^{\circ}\text{C}$  for 5 s, and  $72^{\circ}\text{C}$  for 5 s, and one melting cycle of  $95^{\circ}\text{C}$  for 0 s,  $68^{\circ}\text{C}$  for 15 s, and  $95^{\circ}\text{C}$  for 0 s (with a transition rate of  $0.2^{\circ}\text{C/s}$ ). Samples were then cooled to  $40^{\circ}\text{C}$  for 30 s. On the other hand, in the real-time PCR using TaqMan® probes the conditions for cycling were 10 min at  $95^{\circ}\text{C}$ , and an amplification program of 40 cycles at  $95^{\circ}\text{C}$



Table 1

DNA sequences of the primers and probes used in this study.

Primers and probes	Length (bp)	Sequence (5' to 3')	Description
18SpEUDIR	29	GGTAGTGACGAAAAATAACAATACAGGAC	Positive control forward primer
18SpEUIINV	25	ATACGCTATTGGAGCTGGAATTACC	Positive control reverse primer
18SPROBE	28	FAM-AAGTGGACTCATTCGAATTACAGGGCCXT-BBQ	Positive control probe
12SSTH-FW	27	CCCTTTAAAGACATCTGGTATTGTGAG	Ostrich-specific forward primer
12SSTH-REV	24	TAAATTGTAGGCTCTCTGGGGTTC	Ostrich-specific reverse primer
STH-TM	26	FAM-CGGTATGTACGTGCCCTAGAGCCGAC-BBQ	Ostrich probe
12SpCHICKENDIR	26	ACATAGAACAAACGAAAAAGGATGTG	Chicken forward primer
12SpCHICKENINV	23	CGTCTTAAAGTGAGCTTAGGGCG	Chicken reverse primer
12SpDUCKDIR	24	CATAATTAATACCTGTAAATGCC	Duck forward primer
12SpDUCKINV	25	TCCAGTATGCTTACTTGTACGAC	Duck reverse primer
12SpVACADIR	24	TTAGTTGAATTAGGCCATGAAGCA	Bovine forward primer
12SpVACAINV	29	GTITAAATAGGGTTAAGATGCACTCAATC	Bovine reverse primer
12SCERDDIR	18	CCTCTCAAGCATGTAGT	Swine forward primer
12SCERDINV	23	GTTACGACTGTCTCTCTGTCGA	Swine reverse primer

for 10 s, 63 °C for 30 s, and 72 °C for 1 s. Samples were then cooled to 40 °C for 30 s. In both approaches, the same program was used to amplify the ostrich species-specific system along with the positive control PCR fragment. The crossing point value ( $C_p$ ), which refers to the cycle number where the sample's fluorescence significantly increases above the background level of fluorescence, was calculated automatically by the LightCycler® software as the first maximum of the second derivative of the curve. Unless otherwise indicated, all real-time PCR reactions were carried out in duplicate.

#### 2.4. Construction of standard curves and data analysis

In order to check the ability of the real-time PCR method for quantitative detection, standard curves were constructed using different percentages (25, 10, 5, 1, and 0.1%) of ostrich raw and sterilized binary meat mixtures.

$C_p$  values obtained from each sample with the ostrich-specific system ( $C_{pSP}$ ) were normalized according to the following equation:

$$C_{pSPS} = C_{pEU} \times C_{pSP}/C_{pEUS}$$

where  $C_{pSPS}$  is the normalized  $C_p$  value of the sample analyzed with the ostrich-specific PCR system,  $C_{pEU}$  is the  $C_p$  average value of the standard samples (binary mixtures) in the endogenous PCR system, and  $C_{pEUS}$  is the  $C_p$  value of the sample analyzed with the endogenous PCR system.

In quantification analysis, a standard curve of standard samples plotted against their crossing point is used to determine the concentration of unknown samples. The amount of target DNA in an unknown sample can be measured by interpolation of the normalized  $C_p$  value obtained in the unknown sample in the corresponding standard curve of  $C_p$  values generated from known DNA percentages of the target species. Besides, the correlation between the variables, crossing point ( $C_p$ ) and concentration ( $[ ]$ ) is semilogarithmic:

$$C_p = b \log [ ] + a$$

Where  $b$  is the slope and  $a$  is the intercept.

A validation protocol of linearity test, regression line, sensitivity and precision parameters of the ostrich-specific real-time PCR system was evaluated according to previously described methods (Camacho, Torres, Gil-Alegre, Obregón, & Ruz, 1993; ICH Harmonised Tripartite Guideline, 2005). To carry out the validation of the real-time PCR technique developed in this work, three

separate DNA extractions of each mixture percentage were assayed in different days, using two replicates of each sample.

### 3. Results and discussion

#### 3.1. Real-time PCR system set-up

An ostrich-specific primer pair and a eukaryotic primer set (positive control) were combined in a real-time PCR method for the authentication of ostrich meat. The 12S rRNA mitochondrial gene was chosen as an ostrich-specific marker because mitochondrial DNA is a high copy number target and, as it evolves faster than nuclear DNA, provides the degree of sequence variation required for the identification of closely related species (Colgan et al., 2001). In addition, the use of a conserved region in the nuclear 18S rRNA gene provided a positive control of the total PCR-amplifiable eukaryotic DNA present in the sample. The use of such positive control is important to avoid false negative results due to factors affecting amplification such as DNA degradation, expired reagents, or presence of nucleic acid inhibitors.

As a target site for the specific detection of ostrich DNA, a 155 bp fragment was amplified, while the target site for the positive control (eukaryotic DNA) consisted of a 141 bp DNA fragment. These small amplicons are ideal for use with processed foods where DNA degradation can mean that larger targets (>200 bp) are not always amplified (Dooley, Paine, Garrett, & Brown, 2004). The non-specific fluorescent dye SYBR® Green or species-specific TaqMan® probes were used to accomplish the detection of the target genes.

#### 3.2. Specificity

The two PCR systems (ostrich-specific and positive control) were tested for their selectivity and cross reactivity by analysis of DNAs obtained from different game and domestic meat species. Demonstration of specificity against a large number of species is very important, because when a reduced number of species are used to assess the specificity of the assay, there is always a risk of finding cross-reactivity with not tested close-related species, limiting the value of the assay for routine analysis (Martín, García, Fajardo, López-Calleja, Rojas, Hernández, et al., 2007). All species were analyzed in duplicate (two separate extractions and PCR reactions from each species).

In the real-time PCR assay using SYBR® Green as detection platform, the determination of a PCR positive result and the specificity of the reaction were made based on the presence of a melting curve. The melting temperature ( $T_m$ ), which is specific for each

amplicon, is the temperature at which 50% of the DNA amplicon is in a double-stranded configuration. The  $T_m$  depends on various factors including the amplicon length and the nucleotide sequence. A common problem affecting PCR is the presence of a non-predicted amplicon product. A good primer set results in a single product, distinguished by producing a single melting-curve peak. The ostrich-specific system amplified a 155 bp fragment from raw ostrich DNA ( $C_p$  value of  $16.94 \pm 0.47$ ), with a melting temperature ( $T_m$ ) between 82 and 83 °C (Table 2). The  $C_p$  values measured for DNA extracted from pasteurized and sterilized ostrich meat samples were  $17.83 \pm 0.32$  and  $21.12 \pm 0.28$ , respectively. A sample was declared to contain ostrich DNA when the analysis in the ostrich-specific PCR system produced an amplification product with a melting temperature between 82 and 83 °C, that corresponds to sequence-specific hybridization between the ostrich primers and the homologous ostrich DNA sequence. Non-template controls did not produce amplicons with  $T_m$  between 82 and 83 °C, confirming the specificity of the method.  $C_p$  values between  $37.13 \pm 0.23$  and 40, with  $T_m$  between 76 and 78 °C, were measured when DNA from other game and domestic meat species was tested. Under our experimental conditions, samples with  $C_p$  values above that corresponding to the mean  $C_p$  value of all the non-target species and negative controls minus twice their standard deviation ( $C_p > 37.07$ ) were considered negative for the presence of ostrich DNA. The eukaryotic system amplified a 141 bp fragment from raw samples of all the eukaryotic species analyzed. All species tested showed  $C_p$  values between  $18.65 \pm 0.18$  and  $21.60 \pm 0.27$  (Table 2), and a  $T_m$  between 83.79 and 85.68 °C.

On the other hand, when TaqMan® probes were used as detection platform of the real-time PCR assay, the ostrich-specific system amplified a 155 bp fragment from raw ostrich meat with a  $C_p$  value of  $17.98 \pm 0.15$ . The  $C_p$  values measured for DNA extracted from pasteurized and sterilized ostrich meat samples were  $18.53 \pm 0.23$  and  $21.94 \pm 0.18$ , respectively. A  $C_p$  value of 40 was measured when DNA from other game and domestic meat species was tested which means that no amplification signal was detected after 40 cycles. The endogenous control system amplified a 141 bp fragment from raw samples of all the eukaryotic species analyzed. With this system, all tested species showed  $C_p$  values between  $17.01 \pm 0.17$  and  $20.60 \pm 0.35$  (Table 2). It should be noted that TaqMan® assays require the effective binding of a specific probe in addition to the binding of the specific PCR primers, thus increasing the reaction specificity, and avoiding the need for further analysis (Sawyer, Wood, Shanahan, Gout, & McDowell, 2003).

### 3.3. Efficiency and detection limit

The efficiency and detection limit of the real-time PCR assay developed were evaluated from the analysis of experimental binary mixtures containing 25%, 10%, 5%, 1%, and 0.1% of ostrich meat in a chicken meat matrix. Five ng of DNA from each binary mixture percentage was analyzed with the ostrich-specific system and with the positive control system. Results of the efficiency of the PCR assay for raw and sterilized experimental binary mixtures are shown in Fig. 1 (SYBR® Green approach) and Fig. 2 (TaqMan® approach). The slope of log input amount versus  $\Delta C_p$  has a value of  $-3.41$  for raw mixtures (Fig. 1a) and  $-3.9$  for sterilized binary mixtures (Fig. 1b), when SYBR® Green is used as detection platform. On the other hand, the slope of log input amount versus  $\Delta C_p$  when TaqMan® probes are used has values of  $-3.18$  for raw mixtures (Fig. 2a) and  $-3.65$  for sterilized binary mixtures (Fig. 2b). These values are in both cases near to the slope's value of  $-3.32$  corresponding to a 100% PCR efficiency.

The theoretical detection limit of the ostrich-specific PCR system was estimated from the corresponding curve as the DNA amount yielding a  $C_p$  value of 37.07 (the mean value less twice the standard deviation (SD) of the non-target species and negative controls) if SYBR® Green is used as detection system, or 40 if the detection procedure is carried out using TaqMan® probes. In the first case, this value was  $2.5 \times 10^{-6}$  ng for raw ostrich binary mixtures, and  $2.3 \times 10^{-4}$  ng for sterilized ostrich binary mixtures which corresponds to 0.00049% and 0.0046% of ostrich DNA in a mixture if 5 ng of total DNA are used in the assay. For the approach using TaqMan® probes, the theoretical detection limit of the ostrich-specific PCR system was  $4.8 \times 10^{-7}$  ng for raw ostrich binary mixtures, and  $5.4 \times 10^{-5}$  ng for sterilized ostrich binary mixtures which corresponds to 0.0000096% and 0.001% of ostrich DNA in a mixture if 5 ng of total DNA are used in the assay. It should be noted that although sterilization treatment (121 °C for 20 min) reduces the amount of detectable DNA, positive signals were also observed in thermally treated samples containing 0.1% of ostrich DNA. In this context, the targeted amplicons are short enough to minimize sensitivity to degraded DNA templates as consequence of thermal effects or other preservation treatments in food matrices (Frezza et al., 2003).

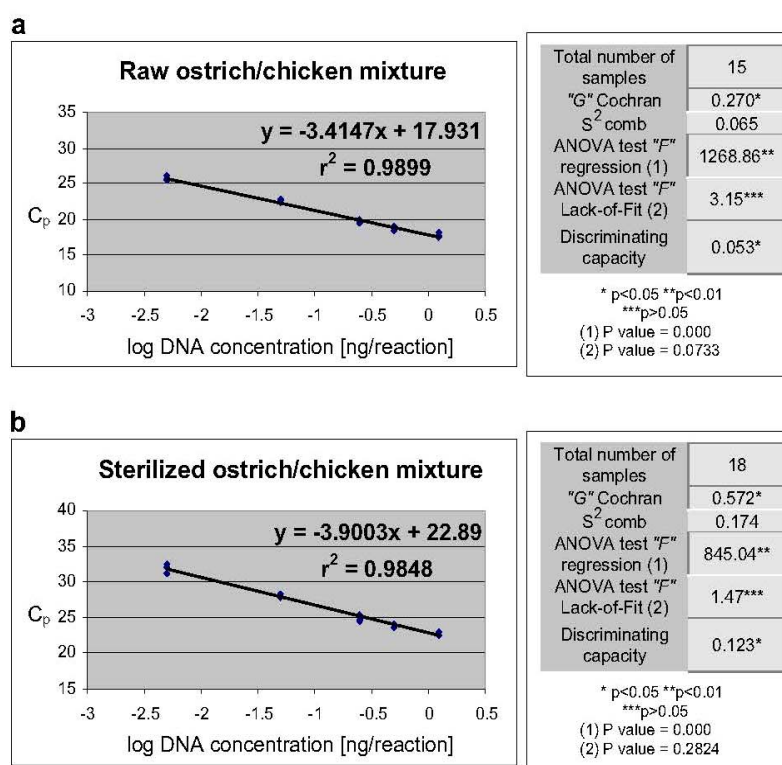
It can be deduced from the results obtained that the real-time PCR method developed allows quantification of minute amounts of ostrich DNA as long as the reference sample used has received the same treatment than the samples analyzed. So, because of the variations found in the amount and quality of amplifiable DNA in

**Table 2**  
Specificity of the ostrich real-time PCR system using SYBR® Green or TaqMan® probes as detection platform ( $C_p$  values obtained from 5 ng DNA).

Species	SYBR® Green approach		TaqMan® approach	
	Ostrich specific PCR system	Positive control PCR system	Ostrich specific PCR system	Positive control PCR system
Ostrich ( <i>Struthio camelus</i> ) raw meat	$16.94 \pm 0.47$	$20.53 \pm 0.11$	$17.98 \pm 0.15$	$17.21 \pm 0.04$
Ostrich ( <i>Struthio camelus</i> ) pasteurized meat	$17.83 \pm 0.32$	$21.09 \pm 0.42$	$18.53 \pm 0.23$	$18.97 \pm 0.21$
Ostrich ( <i>Struthio camelus</i> ) sterilized meat	$21.12 \pm 0.28$	$23.28 \pm 0.23$	$21.94 \pm 0.18$	$23.01 \pm 0.24$
Pheasant ( <i>Phasianus colchicus</i> )	40	$20.74 \pm 0.24$	40	$19.92 \pm 0.14$
Guinea fowl ( <i>Numida meleagris</i> )	40	$19.00 \pm 0.32$	40	$18.34 \pm 0.25$
Chicken ( <i>Gallus gallus</i> )	40	$21.60 \pm 0.27$	40	$20.60 \pm 0.35$
Turkey ( <i>Meleagris gallopavo</i> )	$38.64 \pm 0.18$	$20.54 \pm 0.18$	40	$17.77 \pm 0.32$
Muscovy duck ( <i>Cairina moschata</i> )	$37.13 \pm 0.23$	$19.70 \pm 0.09$	40	$19.00 \pm 0.29$
Goose ( <i>Anser anser</i> )	$39.16 \pm 0.14$	$20.11 \pm 0.22$	40	$19.32 \pm 0.11$
Beef ( <i>Bos taurus</i> )	40	$19.57 \pm 0.21$	40	$18.17 \pm 0.09$
Sheep ( <i>Ovis aries</i> )	40	$18.65 \pm 0.18$	40	$18.25 \pm 0.18$
Goat ( <i>Capra hircus</i> )	$38.20 \pm 0.48$	$18.74 \pm 0.37$	40	$17.01 \pm 0.17$
Pig ( <i>Sus scrofa dom.</i> )	40	$20.77 \pm 0.24$	40	$18.47 \pm 0.16$
Fallow deer ( <i>Dama dama</i> )	$39.12 \pm 0.39$	$20.41 \pm 0.29$	40	$18.01 \pm 0.28$
Roe deer ( <i>Capreolus capreolus</i> )	40	$19.86 \pm 0.32$	40	$18.23 \pm 0.29$
Red deer ( <i>Cervus elaphus</i> )	$37.34 \pm 0.33$	$19.18 \pm 0.11$	40	$17.87 \pm 0.16$

Average  $C_p$  value  $\pm$  SD shown from duplicate reactions  $C_p$  of 40 indicates no amplification after 40 cycles.





**Fig. 1.** Normalized  $C_p$  values obtained using SYBR® Green as detection system from raw (1a) and sterilized (1b) meat mixtures of ostrich in chicken, plotted versus the logarithm of the DNA concentrations. Linearity test, regression line and sensitivity parameters are calculated for the species-specific PCR system. Three different DNA extractions performed on different percentages of ostrich (25, 10, 5, 1 and 0.1%) species in the raw or the sterilized meat mixtures were used as standards.

the real-time PCR assay developed, different calibration curves should be used in accordance with the tissue matrix and the heat treatment applied in order to achieve reliable quantification of ostrich meat content.

#### 3.4. Sensitivity and linearity

Normalized  $C_p$  values obtained from raw and heat-treated meat mixtures of ostrich in chicken, versus the logarithm of the DNA concentrations, were used to test the sensitivity of the real-time PCR method. Figs. 1 and 2 shows the discriminating capacity, which is the least difference in logarithm of target DNA concentration in the mixture that the analytical method can discriminate with a significant level. Linearity of the ostrich real-time PCR response was also analyzed for the experimental raw and heat-treated binary mixtures. In each case, the following parameters were evaluated: (a) Cochran's test, which determined whether the variances of the responses obtained for each concentration of ostrich DNA in the mixtures (raw and heat-treated) were homogeneous, (b) regression analysis, and (c) variance analysis with Lack-of-Fit. The results are also summarized in Figs. 1 and 2.

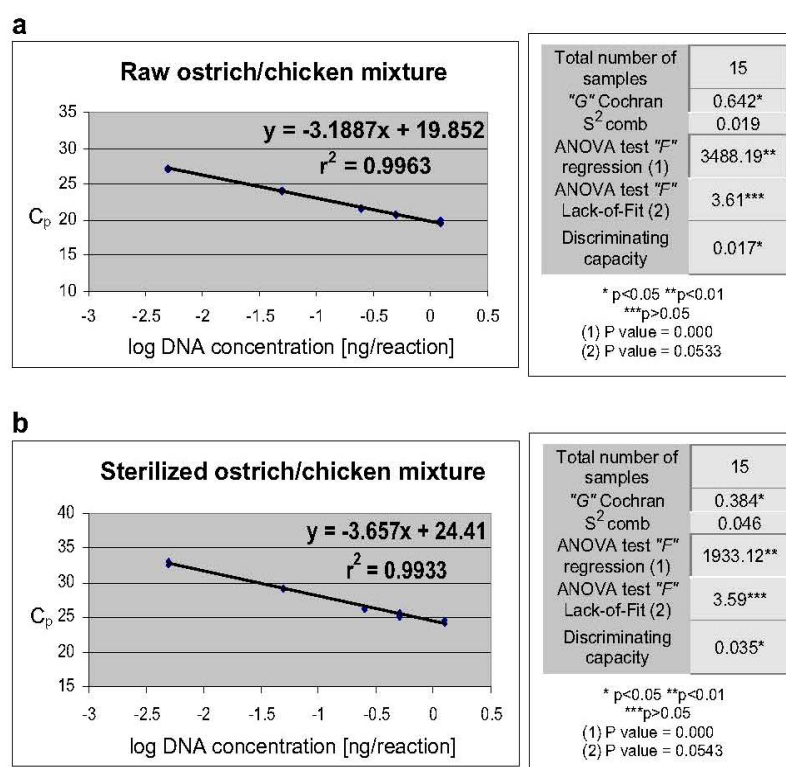
#### 3.5. Accuracy and precision

The accuracy of the assay was determined from three meat percentages (25%, 10%, and 1%) of the raw and heat-treated binary mixtures. Accuracy is reported as percentage recovery by the assay of known added amounts of analyte. Using the Snedecor F-test, it was verified that the concentration of DNA present in a sample did

not affect the variation of the results. The values of the Student's  $t$ -test obtained demonstrated that the method was accurate regardless of the type of reagent used as detection platform, since no significant differences between 100% and the mean recovery values were detected.

The influence of the day of analysis on the precision of the assay was also tested by comparing the coefficients of variation (CV) of three separate DNA extractions performed on the 1% raw and sterilized binary mixtures, analyzed in duplicate three times on the same day, versus the values obtained for the same samples on three different days. Results showed significant differences either using SYBR® Green or TaqMan® probes, with higher CV values when the assay was done on different days with respect to the same day. This could be ascribed to the fact that different master mix vials were used in the assays performed on different days and it could be also attributed to minimal volumetric variations caused by pipetting errors in any of the steps of the real-time PCR experiment (DNA aliquot preparation, mix of reagents, dispensation of the master mix into the PCR capillaries, etc.). Thus, for the quantification of ostrich DNA, a standard curve should be determined on each day of analysis.

It can be deduced from the results reported herein that the use of TaqMan® probes as detection system increased the specificity, efficiency and sensitivity of the real-time PCR assay in comparison with the results obtained with the SYBR® Green approach. However, it should be considered that the application of TaqMan® assays require the availability of primers and probes that must be selected according to very rigid conditions, which cannot always be easily met. Besides, it should also be taken into account the relatively high cost of TaqMan® based approaches compared to SYBR® Green.



**Fig. 2.** Normalized  $C_p$  values obtained using TaqMan® probes as detection system from raw (2a) and sterilized (2b) meat mixtures of ostrich in chicken, plotted versus the logarithm of the DNA concentrations. Linearity test, regression line and sensitivity parameters are calculated for the species-specific PCR system. Three different DNA extractions performed on different percentages of ostrich (25, 10, 5, 1 and 0.1%) species in the raw or the sterilized meat mixtures were used as standards.

Nevertheless, although the cost per reaction can be reduced using SYBR® Green as fluorescent dye instead of oligonucleotide probes, SYBR® Green gives rise to fluorescence signal in the presence of any double-stranded DNA including undesired primer-dimer product (Aarts, Bouwel, Buntjer, Lenstra, & Van Raamsdonk, 2006). This may lead to erroneous readouts because false positives may appear due to unspecific amplification. Moreover, primer-dimer formation interferes with the formation of specific products because of competition of the two reactions for reagents (Kubista et al., 2006). Because of this non-specific nature, investigators are often required to perform additional confirmatory analyses, including melting curves and gel electrophoresis, to determine the quality and accuracy of real-time data, further increasing the cost and time necessary to perform real-time measurements. In contrast, although TaqMan® assays are relatively more expensive than SYBR® Green assays, they are more specific, and do not readily allow melting curve analysis. Thus, the disadvantage of the cost of manufacturing TaqMan® probes is likely offset by the decreased resources and time spent optimizing and validating assays for non-specific intercalating dyes such as SYBR® Green (Houghton & Cockerill, 2006).

### 3.6. Application of the assay to commercial meat products

Although many reports have focused their interest on the development of sensitive and versatile PCR methodologies, the information gained has mainly been based on studies performed with experimental mixtures of raw or heat-treated meat samples rather than commercial meat products, where different types of processing and ingredients may be combined (Pascoal, Prado, Castro, Cepeda, & Barros-Velázquez, 2004). It should be noted

that opportunities for ostrich meat adulteration are greatest in these type products since the original form and texture of meat is changed because of processing and mixing with other meats (Chisholm et al., 2008). In this work 100 commercial ostrich meat products obtained through a broad variety of technological processes, such as mincing, precooking, curing, cooking, smoking, or sterilization, were analyzed in order to evaluate the usefulness of the PCR method developed. It should be clarified that this analysis was carried out using the real-time PCR system based on TaqMan® probes since, as previously described, the specificity, efficiency and sensitivity of the real-time PCR assay is higher when TaqMan® probes are used as detection system. As can be seen in Table 3, the ostrich-specific system successfully detected the presence of ostrich in all the meat products analyzed, thus demonstrating the applicability of the assay to complex meat products.

In addition, commercial meat samples containing more than one species in their composition were also tested for the presence of other animal species stated in the label such as chicken, bovine, pig and duck. For this purpose, conventional PCR assays using species-specific primers for the mentioned species were carried out. In most cases, the results obtained were in accordance with the species composition stated in the labels. However, various dry-cured sausages which were supposed to contain only ostrich meat and bovine milk, produced positive results when they were tested for the presence of pig DNA (Table 3). These results could indicate the existence of a possible fraud in the labelling of these samples derived from the addition of less expensive and more easily available pig meat. Alternatively, the presence of pig DNA in these ostrich dry-cured sausages could also be explained as an unintentional



**Table 3**

Results of the analysis of raw and heat-treated commercial meat products from ostrich using ostrich-specific primers in real-time PCR and chicken, duck, bovine, and pig primers in conventional PCR.

Type of product	Ostrich specific PCR system	Positive control PCR system	Declared ostrich content	Estimated ostrich content	Species stated in the label	Species detected by PCR
Raw steak A	18.71 ± 0.12	17.94 ± 0.17	100%	— <sup>a</sup>	O	O
Raw steak B	18.89 ± 0.32	17.99 ± 0.32	100%	—	O	O
Raw steak C	19.87 ± 0.11	18.21 ± 0.12	100%	—	O	O
Raw steak D	19.50 ± 0.04	18.13 ± 0.24	100%	—	O	O
Raw steak E	19.52 ± 0.12	18.14 ± 0.42	100%	—	O	O
Raw steak F	19.12 ± 0.33	18.02 ± 0.26	100%	—	O	O
Raw steak G	19.32 ± 0.21	18.07 ± 0.21	100%	—	O	O
Raw steak H	18.95 ± 0.23	18.11 ± 0.16	100%	—	O	O
Raw sirloin A	18.51 ± 0.28	17.65 ± 0.15	100%	—	O	O
Raw sirloin B	17.96 ± 0.11	18.20 ± 0.07	100%	—	O	O
Raw sirloin C	19.07 ± 0.16	18.16 ± 0.19	100%	—	O	O
Raw sirloin D	18.97 ± 0.09	18.16 ± 0.06	100%	—	O	O
Raw sirloin E	18.65 ± 0.15	17.98 ± 0.18	100%	—	O	O
Raw sirloin F	19.29 ± 0.15	17.87 ± 0.27	100%	—	O	O
Raw sirloin G	17.92 ± 0.31	18.34 ± 0.09	100%	—	O	O
Raw sirloin H	18.93 ± 0.21	18.32 ± 0.11	100%	—	O	O
Raw hamburger A	17.96 ± 0.22	18.55 ± 0.12	ND <sup>b</sup>	78%	O, P	O, P
Raw hamburger B	17.89 ± 0.17	18.97 ± 0.32	ND	82%	O, P	O, P
Raw hamburger C	18.25 ± 0.27	18.43 ± 0.27	ND	63%	O, P	O, P
Raw hamburger D	18.18 ± 0.11	19.72 ± 0.23	ND	66%	O, P	O, P
Raw hamburger E	18.50 ± 0.11	18.14 ± 0.12	ND	53%	O, P	O, P
Raw hamburger F	18.25 ± 0.25	18.66 ± 0.11	ND	63%	O, P	O, P
Raw hamburger G	18.36 ± 0.23	18.75 ± 0.29	ND	58%	O, P	O, P
Raw hamburger H	18.30 ± 0.21	18.98 ± 0.09	ND	61%	O, P	O, P
Raw hamburger I	17.98 ± 0.19	19.04 ± 0.07	ND	77%	O, P	O, P
Raw hamburger J	17.84 ± 0.45	18.33 ± 0.07	ND	85%	O, P	O, P
Raw hamburger K	17.92 ± 0.23	18.24 ± 0.12	ND	80%	O, P	O, P
Raw hamburger L	17.67 ± 0.08	18.33 ± 0.10	ND	96%	O, P	O, P
Raw hamburger M	17.53 ± 0.07	18.99 ± 0.22	ND	106%	O, P	O, P
Raw hamburger N	17.50 ± 0.04	18.67 ± 0.25	ND	109%	O, P	O, P
Raw hamburger O	18.22 ± 0.12	18.78 ± 0.18	ND	64%	O, P	O, P
Raw hamburger P	17.82 ± 0.14	18.55 ± 0.09	ND	86%	O, P	O, P
Raw hamburger Q	18.32 ± 0.15	18.93 ± 0.03	ND	60%	O, P	O, P
Raw hamburger R	17.92 ± 0.33	18.34 ± 0.11	ND	80%	O, P	O, P
Raw hamburger S	18.52 ± 0.27	18.48 ± 0.15	ND	52%	O, P	O, P
Raw hamburger T	17.77 ± 0.28	19.35 ± 0.17	ND	90%	O, P	O, P
Raw hamburger U	18.34 ± 0.10	18.86 ± 0.19	ND	59%	O, P	O, P
Dry-cured sausage A	17.77 ± 0.17	17.97 ± 0.17	ND	90%	O, M	O, B, P
Dry-cured sausage B	17.99 ± 0.22	18.73 ± 0.22	ND	76%	O, M	O, B, P
Dry-cured sausage C	21.73 ± 0.27	20.01 ± 0.27	ND	5%	O, P	O, P
Dry-cured sausage D	21.13 ± 0.18	19.95 ± 0.18	ND	8%	O, P	O, P
Dry-cured sausage E	20.94 ± 0.11	19.94 ± 0.11	ND	9%	O, P	O, P
Dry-cured sausage F	20.26 ± 0.11	19.98 ± 0.11	ND	15%	O, P	O, P
Dry-cured sausage G	20.32 ± 0.12	20.24 ± 0.12	ND	14%	O, P	O, P
Dry-cured sausage H	17.67 ± 0.24	18.18 ± 0.24	ND	97%	O, M	O, B, P
Dry-cured sausage I	17.63 ± 0.12	17.91 ± 0.12	ND	99%	O, M	O, B, P
Dry-cured sausage J	19.99 ± 0.09	19.60 ± 0.09	ND	18%	O, P	O, P
Dry-cured sausage K	20.81 ± 0.08	19.64 ± 0.08	ND	10%	O, P	O, P
Dry-cured sausage L	19.92 ± 0.21	19.53 ± 0.21	ND	19%	O, P	O, P
Dry-cured sausage M	21.11 ± 0.28	20.07 ± 0.28	ND	8%	O, P	O, P
Dry-cured sausage N	19.92 ± 0.22	19.21 ± 0.27	ND	19%	O, P	O, P
Dry-cured sausage O	18.77 ± 0.14	18.99 ± 0.08	ND	43%	O, M	O, B, P
Dry-cured sausage P	19.14 ± 0.17	19.12 ± 0.19	ND	33%	O, M	O, B, P
Dry-cured sausage Q	19.34 ± 0.33	19.37 ± 0.28	ND	29%	O, M	O, B, P
Dry-cured sausage R	18.84 ± 0.27	18.99 ± 0.29	ND	41%	O, M	O, B, P
Dry-cured sausage S	17.75 ± 0.31	19.12 ± 0.14	ND	91%	O, M	O, B, P
Dry-cured sausage T	17.67 ± 0.17	19.37 ± 0.17	ND	97%	O, M	O, B, P
Dry-cured sausage U	18.74 ± 0.16	18.99 ± 0.23	ND	45%	O, M	O, B, P
Dry-cured sausage V	18.17 ± 0.28	19.12 ± 0.08	ND	67%	O, M	O, B, P
Dry-cured sausage W	18.29 ± 0.31	19.37 ± 0.09	ND	61%	O, M	O, B, P
Smoked meat A	26.39 ± 0.24	22.29 ± 0.24	100%	—	O	O
Smoked meat B	27.04 ± 0.14	22.09 ± 0.21	100%	—	O	O
Smoked meat C	26.45 ± 0.13	22.13 ± 0.15	100%	—	O	O
Smoked meat D	26.59 ± 0.11	22.83 ± 0.09	100%	—	O	O
Braised meat A	19.06 ± 0.32	21.05 ± 0.32	100%	—	O	O
Braised meat B	20.86 ± 0.07	21.89 ± 0.13	100%	—	O	O
Braised meat C	20.79 ± 0.07	21.23 ± 0.14	100%	—	O	O
Braised meat D	19.56 ± 0.13	21.34 ± 0.09	100%	—	O	O
Braised meat E	20.32 ± 0.11	21.97 ± 0.09	100%	—	O	O
Braised meat F	20.87 ± 0.03	22.02 ± 0.08	100%	—	O	O

(continued on next page)



Table 3 (continued)

Type of product	Ostrich specific PCR system	Positive control PCR system	Declared ostrich content	Estimated ostrich content	Species stated in the label	Species detected by PCR
Braised meat G	19.99 ± 0.32	21.45 ± 0.15	100%	—	O	O
Braised meat H	20.76 ± 0.21	21.54 ± 0.13	100%	—	O	O
Braised meat I	20.91 ± 0.25	22.47 ± 0.13	100%	—	O	O
Braised meat J	21.03 ± 0.17	20.99 ± 0.11	100%	—	O	O
Pâté A	30.11 ± 0.15	24.10 ± 0.15	ND	0.5%	O, C, M, P	O, C, B, P
Pâté B	31.61 ± 0.11	24.21 ± 0.11	ND	0.2%	O, C, M, P	O, C, B, P
Pâté C	22.55 ± 0.22	21.70 ± 0.22	20%	64%	O, C, M, D	O, C, B, D
Pâté D	22.85 ± 0.25	22.93 ± 0.25	20%	53%	O, C, M, D	O, C, B, D
Pâté E	23.42 ± 0.17	21.18 ± 0.25	20%	37%	O, C, M, D	O, C, B, D
Pâté F	23.98 ± 0.12	21.99 ± 0.13	20%	26%	O, C, M, D	O, C, B, D
Pâté G	24.43 ± 0.24	21.76 ± 0.16	20%	19%	O, C, M, D	O, C, B, D
Pâté H	22.13 ± 0.27	22.65 ± 0.11	20%	84%	O, C, M, D	O, C, B, D
Pâté I	24.17 ± 0.36	23.01 ± 0.09	20%	23%	O, C, M, D	O, C, B, D
Pâté J	23.15 ± 0.21	22.56 ± 0.24	20%	44%	O, C, M, D	O, C, B, D
Pâté K	22.65 ± 0.05	22.55 ± 0.32	20%	60%	O, C, M, D	O, C, B, D
Pâté L	22.92 ± 0.34	22.81 ± 0.33	20%	51%	O, C, M, D	O, C, B, D
Pâté M	23.28 ± 0.32	23.44 ± 0.13	20%	40%	O, C, M, D	O, C, B, D
Pâté N	29.11 ± 0.13	24.97 ± 0.24	ND	1%	O, C, M, P	O, C, B, P
Pâté O	30.13 ± 0.23	24.99 ± 0.17	ND	0.5%	O, C, M, P	O, C, B, P
Pâté P	31.04 ± 0.26	25.11 ± 0.07	ND	0.3%	O, C, M, P	O, C, B, P
Pâté Q	28.95 ± 0.19	24.86 ± 0.10	ND	1.1%	O, C, M, P	O, C, B, P
Pâté R	22.43 ± 0.22	22.45 ± 0.09	20%	69%	O, C, M, D	O, C, B, D
Pâté S	22.99 ± 0.26	21.99 ± 0.11	20%	49%	O, C, M, D	O, C, B, D
Pâté T	23.93 ± 0.36	23.03 ± 0.18	20%	27%	O, C, M, D	O, C, B, D
Pâté U	23.53 ± 0.11	22.42 ± 0.19	20%	35%	O, C, M, D	O, C, B, D
Pâté V	24.97 ± 0.29	23.97 ± 0.24	ND	14%	O, C, M, P	O, C, B, P
Pâté W	25.32 ± 0.29	23.10 ± 0.28	ND	11%	O, C, M, P	O, C, B, P
Pâté X	24.94 ± 0.36	22.99 ± 0.17	ND	14%	O, C, M, P	O, C, B, P
Pâté Y	22.92 ± 0.21	23.76 ± 0.29	ND	51%	O, C, M, P	O, C, B, P
Pâté Z	22.16 ± 0.23	23.83 ± 0.18	ND	82%	O, C, M, P	O, C, B, P

Average  $C_p$  value ± SD shown from duplicate reactions.

O = Ostrich; P = Pig; M = Milk; B = Bovine; C = Chicken; D = Duck.

<sup>a</sup> Estimated content not determined for being 100% of ostrich meat.<sup>b</sup> Not declared ostrich content.

contamination caused by an inadequate cleaning of the equipments if meat products containing pig are also produced in the same industry.

In order to test the applicability of the technique for the quantification of ostrich in those commercial products containing more than one species in their composition, a quantitative measurement was performed substituting the normalized  $C_p$  values obtained for these products in the standard equations derived from the analysis of the experimental raw (for raw and dry-cured products) or sterilized (for heat-treated products) binary mixtures. However, the results obtained for those products with declared ostrich content indicated a complete disagreement between the ostrich amounts detected and the amounts declared (Table 3). This is ascribed to the fact that, as previously explained, the real-time PCR method developed in the present work only allows quantification of ostrich if the samples analyzed have the same matrix composition and have received the same heat-treatment than the reference samples. Thus, for true quantification, it would be necessary to prepare appropriate calibration standards similar in composition and heat-treatment than the commercial samples. However, the preparation of these calibration standards cannot be performed in practice since tissue composition, heat-treatment, and processing conditions of real meat products from the market are not known. Therefore, although in theory the present real-time PCR technique has the potential for quantitative measurements, the reality is that its application for the analysis of real commercial meat products is limited to a qualitative detection of the target species. Nevertheless, it should be noted that the results obtained in this work demonstrate the usefulness of the present real-time technique for verifying the labelling of ostrich meat products even when it is only applied for detection purposes.

Although there is a large body of literature for the detection and identification of animal species in meat products, the number of assays for the detection of ostrich meat is relatively limited. In this sense, only a few methods based on PCR-RFLP (Abdulmawjood & Bülte, 2002), RAPD analysis (Martínez & Yman, 1998), PCR with species-specific primers (Colombo, Viacava, & Giaretti, 2000), and real-time PCR (López-Andreo et al., 2005) have been reported. However, PCR-RFLP and RAPD methods developed by Abdulmawjood and Bülte (2002), and Martínez and Yman (1998), respectively, may not be applied for the analysis of thermally processed meat harbouring highly fragmented DNA, as well as for admixed samples including two or more species in their composition since the results obtained might show a combination of miscellaneous band patterns representing all the possible species included in the sample (Girish et al., 2005). With respect to the PCR technique with species-specific primers developed by Colombo et al. (2000), it could also be inadequate for the analysis of highly processed samples since it was based in the amplification of a 543 bp ostrich-specific fragment from the cytochrome b. In this sense, it has been demonstrated that the high temperatures and pressures used in the preparation of meat products may cause fragmentation of DNA leading to difficulties to obtain reliable results in PCR amplification of long fragments (Martín, García, Fajardo, López-Calleja, Rojas, Hernández, et al., 2007). On the other hand, the real-time PCR technique developed by López-Andreo et al. (2005) detected ostrich DNA in meat mixtures down to a level of  $3 \times 10^{-5}$  ng, but the assay was not tested on heat-treated meat and ostrich commercial meat products. By contrast, the real-time PCR assay developed in this work has proved to be adequate for the detection of ostrich DNA not only in heat-treated meat samples but also in a wide range of complex commercial meat products. Compared with alternative techniques such as PCR-RFLP, PCR-sequencing, or



conventional PCR with specific primers, the present real-time PCR technique offers the advantage of performing detection measurements at an early stage in the PCR process which is more precise than the endpoint analysis. Moreover, the measurement of fluorescence throughout the reaction eliminates the need for laborious and hazardous post-PCR processing steps, such as agarose gel electrophoresis and ethidium bromide staining of target DNA, easing automation of the technique and large-scale sample processing. In addition, real-time PCR assays are more rapid than endpoint PCR techniques, LightCycler® tests can be completed in 30–40 min, and there is reduced potential for contamination of the PCR mixture with target DNA because the reaction tubes remain closed throughout the assay (Sawyer et al., 2003; Weller, Elphinstone, Smith, Boonham, & Stead, 2000).

In conclusion, real-time polymerase chain reaction represents a powerful technology that is simple and relatively fast, with good sensitivity and specificity. The results obtained in this work suggest that this methodology could be potentially used by regulatory agencies and food control laboratories as routine control assay to authenticate raw ostrich meat before processing and to enforce labelling regulations of ostrich meat products.

### Acknowledgements

This study was supported by Grant No. AGL 2007-60077 from the Ministerio de Educación y Ciencia of Spain and the Programa de Vigilancia Sanitaria 2009/AGR/1489 from the Comunidad de Madrid (Spain). María Rojas, Miguel Ángel Pavón, and Nicolette Pegels are recipients of a fellowship from the Ministerio de Educación y Ciencia (Spain).

### References

- Aarts, H. J., Bouwel, M., Buntjer, J. B., Lenstra, J. A., & Van Raamsdonk, L. W. (2006). Detection of bovine meat and bone meal in animal feed at a level of 0.1%. *Journal of AOAC International*, 89, 1443–1446.
- Abdulmajid, A., & Bülte, M. (2002). Identification of ostrich meat by restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis of cytochrome b gene. *Journal of Food Science*, 67, 1688–1691.
- Alves, E., Castellanos, C., Ovilo, C., Silió, L., & Rodríguez, C. (2002). Differentiation of the raw material of the Iberian pig meat industry based on the use of amplified fragment length polymorphism. *Meat Science*, 61, 157–162.
- Arslan, A., İlhak, I., Calicioglu, M., & Karahan, M. (2005). Identification of meats using random amplified polymorphic DNA (RAPD) technique. *Journal of Muscle Foods*, 16, 37–45.
- Bai, W., Xu, W., Huang, K., Yuan, Y., Cao, S., & Luo, Y. (2009). A novel common primer multiplex PCR (CP-M-PCR) method for the simultaneous detection of meat species. *Food Control*, 20, 366–370.
- Calvo, J. H., Zaragoza, P., & Osta, R. (2001). Random amplified polymorphic DNA fingerprints for identification of species in poultry pâté. *Poultry Science*, 80, 522–524.
- Camacho, M. A., Torres, A. I., Gil-Alegre, M. E., Obregón, M. M., & Ruz, V. (1993). Validation protocol of analytical methods for finished pharmaceutical products. *STP Pharma Practices*, 3, 197–202.
- Chisholm, J., Sánchez, A., Brown, J., & Hird, H. (2008). The development of species-specific real-time PCR assays for the detection of pheasant and quail in food. *Food Analytical Methods*, 1, 190–194.
- Colgan, S., O'Brien, L., Maher, M., Shilton, N., McDonnell, K., & Ward, S. (2001). Development of a DNA-based assay for species identification in meat and bone meal. *Food Research International*, 34, 409–414.
- Colombo, F., Viacava, R., & Giaretti, M. (2000). Differentiation of the species ostrich (*Struthio camelus*) and emu (*Dromaius novaehollandiae*) by polymerase chain reaction using an ostrich-specific primer pair. *Meat Science*, 56, 15–17.
- Corona, B., Leonard, R., Carpio, Y., Uffo, O., & Martínez, S. (2007). PCR detection of DNA of bovine, ovine-caprine and porcine origin in feed as part of a bovine spongiform encephalopathy control program. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 5, 312–317.
- Dooley, J. J., Paine, K. E., Garrett, S. D., & Brown, H. M. (2004). Detection of meat species using TaqMan real-time PCR assays. *Meat Science*, 68, 431–438.
- Fajardo, V., González, I., López-Calleja, I., Martín, I., Hernández, P. E., García, T., et al. (2006). PCR-RFLP authentication of meats from red deer (*Cervus elaphus*), fallow deer (*Dama dama*), roe deer (*Capreolus capreolus*), cattle (*Bos taurus*), sheep (*Ovis aries*), and goat (*Capra hircus*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 1144–1150.
- Fisher, P., Hoffman, L. C., & Mellet, F. D. (2000). Processing and nutritional characteristics of value added ostrich products. *Meat Science*, 55, 251–254.
- Frezza, D., Favaro, M., Vaccari, G., Von-Holst, C., Giambra, V., Anklam, E., et al. (2003). A competitive polymerase chain reaction-based approach for the identification and semiquantification of mitochondrial DNA in differently heat-treated bovine meat and bone meal. *Journal of Food Protection*, 66, 103–109.
- Girish, P. S., Anjaneyulu, A. S. R., Viswas, K. N., Anand, M., Rajkumar, N., Shivakumar, B. M., et al. (2004). Sequence analysis of mitochondrial 12S rRNA gene can identify meat species. *Meat Science*, 66, 551–556.
- Girish, P. S., Anjaneyulu, A. S. R., Viswas, K. N., Shivakumar, B. M., Anand, M., Patel, M., et al. (2005). Meat species identification by polymerase chain reaction–restriction fragment length polymorphism (PCR–RFLP) of mitochondrial 12S rRNA gene. *Meat Science*, 70, 107–112.
- Houghton, S. G., & Cockerill, F. R. (2006). Real-time PCR: overview and applications. *Surgery*, 139, 1–5.
- Huang, M. C., Horng, Y. M., Huang, H. L., Sin, Y. L., & Chen, M. J. (2003). RAPD fingerprinting for the species identification of animals. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 16, 1406–1410.
- ICH Harmonised Tripartite Guideline. (2005). Validation of analytical procedures: text and methodology, Q2, (R1).
- Köppel, R., Zimmerli, F., & Breitenmoser, A. (2009). Heptaplex real-time PCR for the identification and quantification of DNA from beef, pork, chicken, turkey, horse meat, sheep (mutton) and goat. *European Food Research and Technology*, 230, 125–130.
- Kubista, M., Andrade, J. M., Bengtsson, M., Forootan, A., Jonás, J., Lind, K., et al. (2006). The real-time polymerase chain reaction. *Molecular Aspects of Medicine*, 27, 95–129.
- López-Andreo, M., Lugo, L., Garrido-Pertierra, A., Prieto, M. I., & Puyet, A. (2005). Identification and quantification of species in complex DNA mixtures by real-time polymerase chain reaction. *Analytical Biochemistry*, 339, 73–82.
- Lanzilao, I., Bungalassi, F., Fancelli, S., Settimelli, R., & Fani, M. (2005). Polymerase chain reaction–restriction fragment length polymorphism analysis of mitochondrial cytb gene from species of dairy interest. *Journal of AOAC International*, 88, 128–135.
- Mane, B. G., Mendiratta, S. K., & Tiwari, A. K. (2009). Polymerase chain reaction assay for identification of chicken in meat and meat products. *Food Chemistry*, 116, 806–810.
- Martin, I., García, T., Fajardo, V., López-Calleja, I., Hernández, P. E., González, I., et al. (2007). Species-specific PCR for the identification of ruminant species in feedstuffs. *Meat Science*, 75, 120–127.
- Martin, I., García, T., Fajardo, V., López-Calleja, I., Rojas, M., Hernández, P. E., et al. (2007). Mitochondrial markers for the detection of four duck species and the specific identification of Muscovy duck in meat mixtures using the polymerase chain reaction. *Meat Science*, 76, 721–729.
- Martin, I., García, T., Fajardo, V., López-Calleja, I., Rojas, M., Pavón, M. A., et al. (2007). Detection of chicken, turkey, duck, and goose tissues in feedstuffs, using species-specific polymerase chain reaction. *Journal of Animal Science*, 85, 452–458.
- Martin, I., García, T., Fajardo, V., Rojas, M., Pegels, N., Hernández, P. E., et al. (2008). SYBR-Green real-time PCR approach for the detection and quantification of pig DNA in feedstuffs. *Meat Science*, 82, 252–259.
- Martínez, I., & Yman, I. M. (1998). Species identification in meat products by RAPD analysis. *Food Research International*, 31, 459–466.
- McKenna, D. R., Morris, C. A., Keeton, J. T., Miller, R. K., Hale, D. S., Harris, S. D., et al. (2003). Consumer acceptability of processed ostrich meat products. *Journal of Muscle Foods*, 14, 173–179.
- Murugaiah, C., Noor, Z. M., Mastakim, M., Bilung, L. M., Selamat, J., & Radu, S. (2009). Meat species identification and Halal authentication analysis using mitochondrial DNA. *Meat Science*, 83, 57–61.
- Pascoal, A., Prado, M., Castro, J., Cepeda, A., & Barros-Velázquez, J. (2004). Survey of authenticity of meat species in food products subjected to different technological processes, by means of PCR-RFLP analysis. *European Food Research Technology*, 208, 306–312.
- Rojas, M., González, I., Fajardo, V., Martín, I., Hernández, P. E., García, T., et al. (2008). Polymerase chain reaction–restriction fragment length polymorphism authentication of raw meats from game birds. *Journal of AOAC International*, 91, 1416–1422.
- Rojas, M., González, I., Fajardo, V., Martín, I., Hernández, P. E., García, T., et al. (2009a). Identification of raw and heat-processed meats from game bird species by polymerase chain reaction–restriction fragment length polymorphism of the mitochondrial D-loop region. *Poultry Science*, 88, 669–679.
- Rojas, M., González, I., Fajardo, V., Martín, I., Hernández, P. E., García, T., et al. (2009b). Authentication of meats from quail (*Coturnix coturnix*), pheasant (*Phasianus colchicus*), partridge (*Alectoris* spp.), and guinea fowl (*Numida meleagris*) using polymerase chain reaction targeting specific sequences from the mitochondrial 12S rRNA gene. *Food Control*, 20, 896–902.
- Sawyer, J., Wood, C., Shanahan, D., Gout, S., & McDowell, D. (2003). Real-time PCR for quantitative meat species testing. *Food Control*, 14, 579–583.
- Stamoulis, O., Stamatis, C., Sarafidou, T., & Marmaris, Z. (2010). Development and application of molecular markers for poultry meat identification in food chain. *Food Control*, 21, 1061–1065.
- Sun, D. W. (2008). *Modern techniques for food authentication*. Academic Press.
- Tanabe, S., Hase, M., Yano, T., Sato, M., Fujimura, T., & Akiyama, H. (2007). A real-time quantitative PCR detection method for pork, chicken, beef, mutton, and horseflesh in foods. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 71, 3131–3135.
- Weller, S. A., Elphinstone, J. G., Smith, N. C., Boonham, N., & Stead, D. E. (2000). Detection of *Ralstonia solanacearum* strains with a quantitative, multiplex, real-time, fluorogenic PCR (Taqman) assay. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 2853–2858.







Contents lists available at ScienceDirect

Forensic Science International

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/forensi](http://www.elsevier.com/locate/forensi)

## Development of a real-time PCR assay to control the illegal trade of meat from protected capercaillie species (*Tetrao urogallus*)

María Rojas, Isabel González, Miguel Ángel Pavón, Nicolette Pegels, Pablo E. Hernández, Teresa García, Rosario Martín\*

Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, Avenida Puerta de Hierro, S/N, 28040 Madrid, Spain

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 13 July 2010

Received in revised form 5 January 2011

Accepted 20 February 2011

Available online 16 March 2011

#### Keywords:

Capercaillie meat

12S rRNA gene

18S rRNA gene

Real-time PCR

### ABSTRACT

A rapid and highly species-specific real-time polymerase chain reaction (PCR) assay has been developed for the detection of capercaillie DNA (*Tetrao urogallus*) in meat and meat mixtures. The method combines the use of capercaillie-specific primers, that amplify a 142 bp fragment of the mitochondrial 12S rRNA gene, and a positive control primer pair that amplifies a 141 bp fragment of the nuclear 18S rRNA gene from eukaryotic DNA. SYBR® Green dye or TaqMan® fluorogenic probes were used to monitor the amplification of the target genes. Results obtained with the use of TaqMan® probes as detection platform increased the specificity of the real-time PCR assay in comparison with the results obtained using SYBR® Green. The proposed real-time PCR assay represents a rapid and straightforward method for the accurate identification of capercaillie that could be used by law enforcement agencies as a tool for the control of poaching and illegal trade of meat from this protected species.

© 2011 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

Illegal trade and trafficking of endangered and threatened species is a banned practice that has been encouraged in recent years by the increasing worldwide demand for exotic animal species. Each year, millions of protected animals are killed or captured for private zoo collections, hunt trophies, ornamental objects, human consumption, or traditional medicine [1–3]. Combined with other factors such as habitat loss, the illegitimate trade of wildlife species is capable of heavily depleting populations and bringing some species to the brink of extinction [4]. In this sense, according to the latest annual survey compiled by the International Union for the Conservation of Nature (IUCN) nearly 17,300 of the world's 47,677 assessed species are under risk of extinction [5]. In addition, the small population size of some threatened species makes them more vulnerable to poaching.

In order to conserve and manage wildlife, a number of international, national and local laws have been implemented to protect these natural resources from over-exploitation and illicit trade [6]. However, despite these laws, it is generally difficult to obtain evidences of illegal trading or hunting of protected species due to the types of products involved, which are typically processed and difficult to identify using morphological techniques [7]. Taking into account these aspects, there is a need for the

development of accurate and efficient methods of species identification in order to detect, monitor and control the wildlife trade.

A particular endangered species susceptible for illegal trade and poaching is the capercaillie (*Tetrao urogallus*). The capercaillie is a mountain galliform belonging to the *Tetraonidae* family, distributed from Western Europe to Eastern Siberia [8]. The degree of legal protection for the capercaillie, contemplated in EU Birds Directive 2009/147/CE Annex I, Annex II/2, and Annex III/2 [9], varies among the countries. In general, capercaillie is effectively protected in western and central European countries e.g. Spain, Greece, and Belgium. In Western Europe, populations are the most threatened and close to extinction due to small population size, habitat degradation, and poaching [10]. The Iberian peninsula host two of the most threatened capercaillie populations: the Cantabrian capercaillie (*T. urogallus cantabricus*), which dwells throughout the Cantabrian mountain range in the north of Spain, and the Pyrenean capercaillie (*T. urogallus aquitanicus*) in the Pyrenees, a ranged shared with Andorra and France [11]. Both subspecies are included in the Spanish National Catalogue of Endangered Species [12] and are now the focus of several conservation plans [13]. However, despite these protection measures, poaching and illegal trade of capercaillie meat still persist. Thus, the development of an effective method for the identification of capercaillie meat is hardly needed in order to prevent trading and hunting of some of the last remaining wild individuals.

Identification of the species origin of tissue materials from poached animals has been traditionally accomplished through

\* Corresponding author. Tel.: +34 913943752; fax: +34 913943743.  
E-mail address: [rmartins@vet.ucm.es](mailto:rmartins@vet.ucm.es) (R. Martín).



morphological, electrophoretic or immunological techniques [14–16]. However, these methods are not very effective in forensic cases where samples are often degraded and/or heat processed. In recent years, attention has been turning towards DNA-based methods, which have proven to be a reliable, sensitive and fast alternative for the detection of illegal trade of wildlife species [17,18]. DNA offers the advantage of being a relatively stable and long-lived biological molecule, is more able to withstand heat processing and also its structure is conserved within all tissues of an individual [19]. Among DNA based methods, the polymerase chain reaction (PCR) coupled with techniques such as nucleotide sequencing [7,20], restriction fragment length polymorphism (RFLP) [21,22], or PCR with species-specific primers [23,24] have been extensively applied for the identification of meat from a wide range of protected wildlife species including tiger, leopard, or white shark. However, these techniques present limitations such as the requirement of post-amplification handling of PCR products, thereby extending the risk of laboratory contamination and false-positive results, and the dependence on agarose gel electrophoresis for analysis of the products. Recently, the emergence of real-time PCR methodology has provided sensitive and safe solutions by monitoring PCR products continuously using fluorescent markers. The use of fluorescence for detection purposes eliminates the need for post-PCR processing steps and allows the selection of short sequences for amplification, which may be critical when obtaining DNA from processed meat or highly deteriorated forensic samples [25,26]. Nevertheless, although a wide number of real-time PCR methods have been developed for the detection and identification of meat species in food [27–30], fewer real-time PCR approaches have been reported so far within the field of wildlife forensics [31].

There are various fluorescence based chemistries adapted to real-time PCR detection, which can be classified into two categories: double-stranded DNA intercalating dyes such as SYBR® Green, or specific chemistries such as TaqMan® probes. SYBR® Green dye enables simultaneous and rapid detection of DNA. However the non-specific nature of this marker gives rise to fluorescence signal in the presence of any double stranded DNA including undesired primer-dimer products [32]. This may lead to erroneous readouts because false positives may appear due to unspecific amplification. Besides, primer-dimer formation interferes with the formation of specific products because of competition of the two reactions for reagents [33]. Because of this non-specific nature, investigators are often required to perform additional confirmatory analyses, including melting curves and gel electrophoresis, to determine the quality and accuracy of real-time data which increases the time necessary to perform real-time measurements. By contrast, TaqMan® fluorogenic probes specifically hybridize within the target sequence bound by usual PCR primers which enhances dramatically the specificity of the assay and decreases the amount of time required for assay development and optimization. However, the application of TaqMan® assays require the availability of primers and probes that must be selected according to very rigid conditions, which cannot always be easily met. In addition, real-time PCR assays based on TaqMan® probes present a higher cost compared to SYBR® Green approaches [34].

In this work we describe the development of a real-time PCR assay for the detection of capercaillie DNA (*T. urogallus*) in meat and meat mixtures using the non-specific fluorescent dye SYBR® Green and species-specific TaqMan® probes. The assay targets a species-specific sequence on the 12S rRNA gene and makes use of a eukaryotic system based on a 18S rRNA fragment as positive control.

## 2. Material and methods

### 2.1. Selection of samples and DNA extraction

Authentic muscle samples of Pyrenean capercaillie (*T. urogallus aquitanicus*) were obtained from the Department of Animal Pathology (Facultad de Veterinaria, Universidad Autónoma de Barcelona, Spain). Cantabrian capercaillie feathers (*T. urogallus cantabricus*) were obtained from several zoological parks of the distribution range. Quail (*Coturnix coturnix*), pheasant (*Phasianus colchicus*), red-legged partridge (*Alectoris rufa*), chukar partridge (*Alectoris chukar*), guinea fowl (*Numida meleagris*), Eurasian woodcock (*Scolopax rusticola*), common pigeon (*Columba livia*), woodpigeon (*Columba palumbus*), song thrush (*Turdus philomelos*), ostrich (*Struthio camelus*), chicken (*Gallus gallus*), turkey (*Meleagris gallopavo*), Muscovy duck (*Cairina moschata*), goose (*Anser anser*), beef (*Bos taurus*), sheep (*Ovis aries*), goat (*Capra hircus*), pig (*Sus scrofa domestica*), red-deer (*Cervus elaphus*), fallow-deer (*Dama dama*), and roe-deer (*Capreolus capreolus*) meat samples were obtained from different sources [35]. All specimens were morphologically identified by professional veterinarians before obtaining the samples.

Fresh muscle portions and feathers from the selected specimens were processed immediately or stored frozen at  $-20^{\circ}\text{C}$  until use. Capercaillie meat was also analysed after being subjected to experimental pasteurization ( $72^{\circ}\text{C}$  for 30 min) and sterilization ( $121^{\circ}\text{C}$  for 20 min) treatments.

Binary mixtures containing 0.1%, 1%, 5%, 10%, and 25% (wt/wt) of capercaillie meat in chicken meat were prepared to a final weight of 5 g. Two and a half grams of each mixture were sterilized at  $121^{\circ}\text{C}$  for 20 min.

Total DNA was extracted from meat and feather quills following a previously described method [35]. Feather quills were cut into small pieces before DNA extraction. DNA concentration was measured with a NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop Technologies Inc., Montchanin, DE).

### 2.2. Primers and probes design

12S-Fw and 12S-Rev oligonucleotides designed by Fajardo et al. [36] were used for the amplification, purification and sequencing of an approximately 720 bp conserved fragment of the 12S rRNA gene from capercaillie samples following the procedure described by Rojas et al. [35]. The nucleotide sequences obtained from capercaillie 12S rRNA gene (AM902520, FN675567–FN675574) were aligned and compared with various avian 12S rRNA sequences, obtained previously [35]. Based upon detailed analysis and comparison of the aligned 12S rRNA sequences, a primer pair (12STeu-Fw/12STeu-Rev) was designed for the amplification of a capercaillie-specific 142 bp fragment. These primers were designed for the amplification of both Cantabrian and Pyrenean capercaillie since the similarity between their 12S rRNA sequences prevented the design of specific primers for each one of the two subspecies. Besides, 18SpEuDir and 18SpEuInv primers based on conserved 18S rRNA gene sequences available in the Genbank/EMBL database for various avian and mammal species were used as positive control of the PCR assay. These primers were expected to amplify a conserved fragment of 141 bp from the 18S rRNA gene in all the analysed species. The use of such positive control is important to reveal possible failures in amplification reactions due to DNA degradation, equipment deficiency or presence of nucleic acid inhibitors [37].

The EMMA program included in the EMBL software package version 2.0 and Primer Express 2.0 software (Perkin-Elmer/Applied Biosystems Division, Foster City, CA, USA) was used for sequence alignment and primer design.

To accomplish the detection procedure in the real-time PCR approach using TaqMan® probes, a capercaillie-specific fluorescent hybridization TaqMan® probe (Teu-TM) was used. In addition, another TaqMan® probe (18SProbe) based on conserved 18S rRNA gene sequences available in the Genbank/EMBL database for various avian and mammal species was used as positive control in the real-time PCR system. TaqMan® probes were designed and synthesized by TibMolBiol (Berlin, Germany). The TaqMan® probes were aimed to anneal within the gene fragment generated by amplification of the corresponding target and were labeled on the 5' end with the fluorescent reporter dye 6-carboxyfluorescein (FAM) and on the 3' end with the blackberry (BBQ) fluorescent quencher.

Sequences and description of the primers and probes used in this work are summarized in Table 1.

### 2.3. PCR conditions

Real-time PCR was run under generic cycling conditions. To determine the optimal quantity of primers, preliminary tests were performed using equimolar primer concentrations (50 nM, 300 nM, and 900 nM). The concentrations of primers yielding the highest endpoint fluorescence and the lowest  $C_p$  (data not shown) were 900 nM of specific capercaillie forward primer (12STeu-Fw) and 900 nM of reverse primer (12STeu-Rev). The positive control system used 300 nM of forward primer (18SpEuDir) and 900 nM of reverse primer (18SpEuInv). The PCR reactions were carried out using the LightCycler® Fast Start DNA Master<sup>PLUS</sup> SYBR® Green I (Roche Applied Science, Ponsberg, Germany) in the SYBR® Green approach, whereas the LightCycler® TaqMan® Master (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) and 2 pmol of TaqMan® probe (TibMolBiol), were used in the TaqMan® assay. In both cases 5 ng of DNA were used. Two negative controls using sterile water in place of DNA were also included in each assay. Amplification reactions were performed in



**Table 1**  
DNA sequences of the primers and probes used in this study.

Primers and probes	Length (bp)	Sequence (5'–3')	Description
12STeu-Fw	22	GGATCCACTTAAGGCCCTCAT	Capercaillie-specific forward primer
12STeu-Rev	23	TAGTTCTCAGGCGGATACAAGGG	Capercaillie-specific reverse primer
Teu-TM	26	FAM-CTGCATGATTAATTTAAGCCACGAAAGCC-BBQ	Capercaillie probe
18SpEuDir	29	GGTAGTGACGAAAAATAACAATACAGGAC	Positive control forward primer
18SpEuInv	25	ATACGCTATTGGAGCTGGAATTACC	Positive control reverse primer
18SProbe	29	FAM-AAGTGGACTCATTCGAATTACAGGCCCT-BBQ	Positive control probe

a total reaction volume of 10 µL in a glass capillary tube and were run on the LightCycler® 2.0 Instrument (Roche Applied Science, Penzberg, Germany). For the real-time PCR assay using SYBR® Green as detection platform the following program was used: 10 min at 95 °C (denaturation and Taq polymerase activation), an amplification program of 40 cycles at 95 °C for 10 s, 62 °C for 5 s, and 72 °C for 5 s, and one melting cycle of 95 °C for 0 s, 67 °C for 15 s, and 95 °C for 0 s (with a transition rate of 0.2 °C/s). Samples were then cooled to 40 °C for 30 s. In the real-time PCR using TaqMan® probes the conditions for cycling were 10 min at 95 °C, and an amplification program of 40 cycles at 95 °C for 10 s, 62 °C for 30 s, and 72 °C for 1 s. Samples were then cooled to 40 °C for 30 s. In both approaches, the same program was used to separately amplify the capercaillie species-specific and the positive control PCR fragments. The crossing point value ( $C_p$ ), which refers to the cycle number where the sample's fluorescence significantly increases above the background level of fluorescence, was calculated automatically by the LightCycler® software as the first maximum of the second derivative of the curve. Unless otherwise indicated, all real-time PCR reactions were carried out in duplicate.

### 3. Results and discussion

#### 3.1. Real-time PCR system set-up

The primary objective of the PCR system setup was to establish an adequate marker for capercaillie detection. As a target gene for real-time PCR, a fragment of the mitochondrial 12S rRNA gene was selected. The advantage of mitochondrial-based DNA analyses derives from the fact that these markers are present in multiple copies per cell which increases the sensitivity of the PCR assay when analysing degraded and heat-processed samples that typically contain relatively low amounts of DNA [38]. Besides,

within the 12SrRNA gene there is sufficient polymorphism to separate even closely related species [39]. In addition, the use of a conserved region in the nuclear 18S rRNA gene provided a positive control of the total PCR-amplifiable eukaryotic DNA present in the sample.

Once the targets were chosen, a capercaillie-specific primer pair and a eukaryotic primer set (positive control) were used in a real-time PCR assay for the detection of capercaillie meat. The non-specific fluorescent dye SYBR® Green or species-specific TaqMan® probes were used to accomplish the detection of the target genes. With respect to the specific system, capercaillie-specific primers (12STeu-Fw/12STeu-Rev) amplified a specific 142 bp fragment from capercaillie DNA. On the other hand, the positive control primer pair (18SpEuDir–18SpEuInv) was designed to amplify a DNA fragment of 141 bp from all the eukaryotic organisms tested with approximately the same efficiency.

#### 3.2. Specificity

The two PCR systems (capercaillie-specific and positive control) were tested for their selectivity and cross reactivity by analysis of DNAs obtained from different wild and domestic species. All species were analysed in duplicate (two separate extractions and PCR reactions from each species).

In the real-time PCR assay using SYBR® Green as detection platform, the determination of a PCR positive result and the

**Table 2**  
Specificity of the capercaillie real-time PCR system using SYBR® Green or TaqMan® probes as detection platform ( $C_p$  values obtained from 5 ng DNA).

Species	SYBR® Green approach		TaqMan® approach	
	Capercaillie specific PCR system	Positive control PCR system	Capercaillie specific PCR system	Positive control PCR system
Capercaillie ( <i>Tetrao urogallus</i> ) raw meat	17.55 ± 0.27	19.63 ± 0.11	21.38 ± 0.15	16.81 ± 0.24
Capercaillie ( <i>Tetrao urogallus</i> ) pasteurized meat	18.53 ± 0.32	20.09 ± 0.23	22.13 ± 0.21	17.99 ± 0.22
Capercaillie ( <i>Tetrao urogallus</i> ) sterilized meat	20.09 ± 0.24	22.27 ± 0.21	23.94 ± 0.22	19.93 ± 0.24
Capercaillie ( <i>Tetrao urogallus</i> ) feathers	20.66 ± 0.51	22.41 ± 0.34	23.82 ± 0.42	19.98 ± 0.59
Quail ( <i>Coturnix coturnix</i> )	38.14 ± 0.11	22.18 ± 0.41	40.00	18.66 ± 0.23
Pheasant ( <i>Phasianus colchicus</i> )	37.91 ± 0.16	19.34 ± 0.23	40.00	19.26 ± 0.19
Guinea fowl ( <i>Numida meleagris</i> )	37.11 ± 0.24	19.76 ± 0.35	40.00	17.54 ± 0.25
Red-legged partridge ( <i>Alectoris rufa</i> )	40.00	20.41 ± 0.13	40.00	16.87 ± 0.19
Chukar partridge ( <i>Alectoris chukar</i> )	40.00	21.16 ± 0.11	40.00	16.91 ± 0.17
Common pigeon ( <i>Columba livia</i> )	37.04 ± 0.25	21.48 ± 0.26	40.00	17.36 ± 0.27
Woodpigeon ( <i>Columba palumbus</i> )	38.99 ± 0.36	21.12 ± 0.43	40.00	16.98 ± 0.22
Eurasian woodcock ( <i>Scolopax rusticola</i> )	40.00	21.21 ± 0.26	40.00	18.01 ± 0.31
Song thrush ( <i>Turdus philomelos</i> )	40.00	20.12 ± 0.27	40.00	19.16 ± 0.16
Ostrich ( <i>Struthio camelus</i> )	40.00	20.87 ± 0.10	40.00	17.31 ± 0.17
Chicken ( <i>Gallus gallus</i> )	36.94 ± 0.19	19.98 ± 0.26	40.00	19.88 ± 0.19
Turkey ( <i>Meleagris gallopavo</i> )	39.32 ± 0.21	18.76 ± 0.19	40.00	17.17 ± 0.32
Muscovy duck ( <i>Cairina moschata</i> )	40.00	18.43 ± 0.16	40.00	18.45 ± 0.21
Goose ( <i>Anser anser</i> )	40.00	19.11 ± 0.16	40.00	18.78 ± 0.11
Beef ( <i>Bos taurus</i> )	37.15 ± 0.33	18.14 ± 0.21	40.00	17.77 ± 0.19
Sheep ( <i>Ovis aries</i> )	39.23 ± 0.38	18.04 ± 0.18	40.00	17.65 ± 0.18
Goat ( <i>Capra hircus</i> )	40.00	17.37 ± 0.32	40.00	16.36 ± 0.09
Pig ( <i>Sus scrofa dom.</i> )	37.26 ± 0.31	19.72 ± 0.24	40.00	17.97 ± 0.16
Fallow deer ( <i>Dama dama</i> )	40.00	20.11 ± 0.21	40.00	17.69 ± 0.28
Roe deer ( <i>Capreolus capreolus</i> )	40.00	18.26 ± 0.32	40.00	18.03 ± 0.24
Red deer ( <i>Cervus elaphus</i> )	40.00	18.09 ± 0.11	40.00	17.35 ± 0.16

Average  $C_p$  value ± SD shown from duplicate reactions.  $C_p$  of 40.00 indicates no amplification after 40 cycles.

specificity of the reaction were made based on the presence of a melting curve. The melting temperature ( $T_m$ ), which is specific for each amplicon, is the temperature at which 50% of the DNA amplicon is in a double-stranded configuration. The  $T_m$  depends on various factors including the amplicon length and the nucleotide sequence. A common problem affecting PCR is the presence of a non-predicted amplicon product. A good primer set results in a single product, distinguished by producing a single melting-curve peak. The capercaillie-specific system amplified a 142 bp fragment from raw capercaillie meat ( $C_p$  value of  $17.55 \pm 0.27$ ) with a melting temperature ( $T_m$ ) between 81.5 and 82.5 °C (Table 2). The  $C_p$  values measured for DNA extracted from pasteurized and sterilized capercaillie meat samples were  $18.53 \pm 0.32$  and  $20.09 \pm 0.24$ , respectively. On the other hand, DNA extracted from capercaillie feathers was also amplified with the capercaillie-specific system ( $C_p$  value of  $20.66 \pm 0.51$ ) thus demonstrating the applicability of the method for the detection of capercaillie even from samples where there is a low level of amplifiable target DNA. A sample was declared to contain capercaillie DNA when the analysis in the capercaillie-specific PCR system produced an amplification product with a melting temperature between 81.5 and 82.5 °C, corresponding to sequence-specific hybridization between the capercaillie primers and the homologous capercaillie DNA sequence. Negative controls without DNA and non-target species did not produce amplicons with  $T_m$  between 81.5 and 82.5 °C, confirming the specificity of the method.  $C_p$  values between 36.94  $\pm$  0.19 and 40.00 were measured when DNA from other wild and domestic meat species was tested. Under our experimental conditions, samples with  $C_p$  values above that corresponding to the mean  $C_p$  value of all the non-target species and negative controls minus twice their standard deviation ( $C_p > 36.51$ ) were considered negative for the presence of capercaillie DNA. The eukaryotic system amplified a 141 bp fragment from raw meat samples of all the eukaryotic species analysed. All species tested showed  $C_p$  values between 17.37  $\pm$  0.32 and 22.18  $\pm$  0.41 (Table 2), and a  $T_m$  between 83.12 and 85.11 °C.

On the other hand, when TaqMan® probes were used as a detection platform of the real-time PCR assay, the capercaillie-specific system amplified a 142 bp fragment from raw capercaillie meat with a  $C_p$  value of  $21.38 \pm 0.15$ . The  $C_p$  values measured for DNA extracted from pasteurized and sterilized capercaillie meat samples, and from capercaillie feathers were  $22.13 \pm 0.21$ ,  $23.94 \pm 0.22$ , and  $23.82 \pm 0.42$ , respectively. A  $C_p$  value of 40.00 was measured when DNA from other wild and domestic meat species was tested which means that no amplification signal was detected after 40 cycles. The endogenous control system amplified a 141 bp fragment from raw meat samples of all the eukaryotic species analysed. With this system, all tested species showed  $C_p$  values between 16.36  $\pm$  0.09 and 19.88  $\pm$  0.19 (Table 2). It should be noted that TaqMan® assays require the effective binding of a specific probe in addition to the binding of the specific PCR primers, thus increasing the reaction specificity, and avoiding the need for further analysis [40].

### 3.3. Efficiency and detection limit

The efficiency and detection limit of the real-time PCR assay developed were evaluated from the analysis of experimental binary mixtures containing 25%, 10%, 5%, 1%, and 0.1% of capercaillie meat in a chicken meat matrix. Five ng of DNA from each binary mixture percentage was analysed with the capercaillie-specific system and with the positive control system. Results of the efficiency of the PCR assay for raw and sterilized experimental binary mixtures are shown in Fig. 1 (SYBR® Green approach) and Fig. 2 (TaqMan® approach). The slope of log input amount versus  $\Delta C_p$  has a value of  $-3.46$  for raw mixtures (Fig. 1a) and  $-3.78$  for sterilized binary mixtures (Fig. 1b), when SYBR® Green

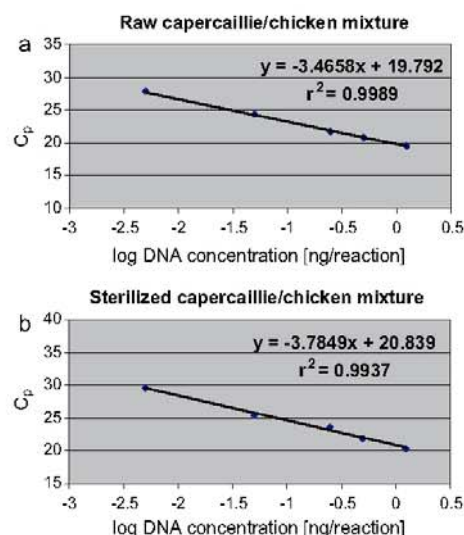


Fig. 1.  $C_p$  values obtained using SYBR® Green as detection system from raw (a) and sterilized (b) meat mixtures of capercaillie in chicken, plotted versus the logarithm of the DNA concentrations. Three different DNA extractions performed on different percentages of capercaillie (25, 10, 5, 1 and 0.1%) in the raw or the sterilized meat mixtures were used as standards.

is used as detection platform. On the other hand, the slope of log input amount versus  $\Delta C_p$  when TaqMan® probes are used has values of  $-3.43$  for raw mixtures (Fig. 2a) and  $-3.55$  for sterilized binary mixtures (Fig. 2b). These values are in both cases near to the slope's value of  $-3.32$  corresponding to a 100% PCR efficiency.

The theoretical detection limit of the capercaillie-specific PCR system was estimated from the corresponding curve as the DNA amount yielding a  $C_p$  value of 36.51 (the mean value less twice the standard deviation (SD) of the non-target species and negative controls) if SYBR® Green is used as detection system, or 40.00 if the

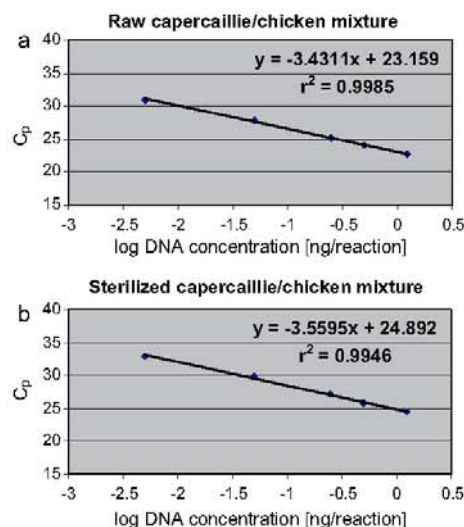


Fig. 2.  $C_p$  values obtained using TaqMan® probes as detection system from raw (a) and sterilized (b) meat mixtures of capercaillie in chicken, plotted versus the logarithm of the DNA concentrations. Three different DNA extractions performed on different percentages of capercaillie (25, 10, 5, 1 and 0.1%) in the raw or the sterilized meat mixtures were used as standards.



detection procedure is carried out using TaqMan® probes. In the SYBR® Green approach, this value was  $1.5 \times 10^{-5}$  ng for raw capercaillie binary mixtures, and  $7.2 \times 10^{-5}$  ng for sterilized capercaillie binary mixtures which corresponds to 0.0003% and 0.0014% of capercaillie DNA in a mixture if 5 ng of total DNA are used in the assay. For the approach using TaqMan® probes, the theoretical detection limit of the capercaillie-specific PCR system was  $1.2 \times 10^{-5}$  ng for raw binary mixtures, and  $5.7 \times 10^{-5}$  ng for sterilized binary mixtures which corresponds to 0.00024% and 0.0011% of capercaillie DNA in a mixture if 5 ng of total DNA are used in the assay. It should be noted that although sterilization treatment (121 °C for 20 min) reduces the amount of detectable DNA, positive signals were also observed in thermally treated samples containing 0.1% of capercaillie DNA. Several authors have reported that heating animal tissues to temperatures over 100 °C causes fragmentation of DNA and decreases the amount of template material available for amplification, leading to difficulties in obtaining reliable amplification results [25,41–43]. In the present work, the length of the amplified DNA fragments (<200 bp) minimized sensitivity to degraded DNA templates. It can be deduced from the results that the use of TaqMan® probes as detection system slightly increased the sensitivity and efficiency of the real time PCR assay. Moreover, the specificity of the TaqMan® assay was much higher than the specificity obtained in the SYBR® Green approach.

The vast majority of PCR approaches published so far about capercaillie species were focused in the analysis of feathers and fecal samples using microsatellite markers and DNA sequencing for the study of genetic variability of populations [44–47]. However, there are relatively few published reports on the application of PCR technology for the identification of capercaillie meat in the field of wildlife forensics. In this sense, only two PCR–RFLP methods previously developed in our laboratory [35,48] targeting sequences from the mitochondrial 12S rRNA gene and the mitochondrial D-loop region, respectively, have been reported for the authentication of capercaillie meat. However, in the analysis of thermally processed meats or degraded samples harboring highly fragmented DNA, these PCR–RFLP techniques may be unsuitable for capercaillie species identification since relatively large amplicons (720 and 310 bp, respectively) are required to carry out enzymatic restriction of DNAs. Besides, the applicability of PCR–RFLP methodology may be restricted in the analysis of admixed meats, because results obtained after digestion of the PCR products might show a combination of miscellaneous restriction patterns representing all the possible species included in the sample [49]. Considering these aspects, the real-time PCR assay described herein using species-specific primers directed to short DNA fragments may be more appropriate for capercaillie species identification in meat samples submitted to different processing treatments and meat samples containing two or more species in their composition.

The development of accurate techniques that allow the correct identification of wildlife species is a fundamental requirement for conservation biologist and for an effective implementation of any legislation for illegal trade. In the case of capercaillie the development of such methods is very important because although hunting and consumption of capercaillie meat is forbidden in many countries, many poachers continue killing capercaillie individuals in order to trade their meat. This meat is sold in many cases for private consumption or sometimes it is even illegally served as a delicatessen in some restaurants due to its particular flavor. However because of the similarities in appearance between capercaillie meat and meat from other animal species it is not always easy for law enforcement authorities to confirm the meat species identity. This fact could lead to significant levels of exploitation and illegal trade of capercaillie to go undetected. In

this context, the results obtained in the present work demonstrate that the real-time PCR technique developed could provide a useful alternative for the detection of such illicit practices thus proving its applicability to current and future capercaillie conservation and trade monitoring efforts.

In conclusion, the real-time PCR technique developed in this work using SYBR® Green and TaqMan® probes represents a powerful and rapid technology for the detection of meat from protected capercaillie species. Moreover, the assay has proved to work well even for the analysis of sterilized meat samples which were expected to contain a large amount of degraded DNA resulting from cooking processing, and also for the identification of capercaillie feathers. Consequently, this methodology could be used by law enforcement agencies as a tool for the control of poaching and illegal trade of meat from capercaillie, thereby helping conservation plans to save this species from extinction.

#### Acknowledgements

This study was supported by Grant No. AGL 2007-60077 from the Ministerio de Educación y Ciencia of Spain and the *Programa de Vigilancia Sanitaria 2009/AGR/1489* from the Comunidad de Madrid (Spain). Miguel Ángel Pavón, and Nicolette Pegels are recipients of a fellowship from the Ministerio de Educación y Ciencia (Spain).

We are indebted to Dr. Santiago Lavín González (Facultad de Veterinaria, Universidad Autónoma de Barcelona) and Dr. Juan José Negro Balmaseda (Estación Biológica de Doñana, Sevilla), for kindly supplying capercaillie and red-legged partridge samples.

#### References

- [1] H.M. Hsieh, L.H. Huang, L.C. Tsai, Y.C. Kuo, H.H. Meng, A. Linacre, J.C.I. Lee, Species identification of rhinoceros horns using the cytochrome b gene, *Forensic Sci. Int.* 136 (2003) 1–11.
- [2] M. Moore, J.A. Bemiss, S.M. Rice, J.M. Quattro, C.M. Woodley, Use of restriction fragment length polymorphisms to identify sea turtle eggs and cooked meats to species, *Conserv. Genet.* 4 (2003) 95–103.
- [3] A. Singh, A. Gaur, K. Shailaja, B.S. Bala, L. Singh, A novel microsatellite (STR) marker for forensic identification of big cats in India, *Forensic Sci. Int.* 141 (2004) 143–147.
- [4] C. Sharma, Enforcement mechanisms for endangered species protection in Hong Kong: a legal perspective, *Vermont J. Environ. Law* 5 (2003) 1–34.
- [5] IUCN, Numbers of threatened species by major groups of organisms (1996–2009), (2009). [http://www.iucnredlist.org/documents/summarystatistics/2009RL\\_Stats\\_Table\\_1.pdf](http://www.iucnredlist.org/documents/summarystatistics/2009RL_Stats_Table_1.pdf).
- [6] C.J. Kyle, C.C. Wilson, Mitochondrial DNA identification of game and harvested freshwater fish species, *Forensic Sci. Int.* 166 (2007) 68–76.
- [7] M.J. Eaton, G.L. Meyers, S.O. Kolokotronis, M.S. Leslie, A.P. Martin, G. Amato, Barcoding bushmeat: molecular identification of Central African and South American harvested vertebrates, *Conserv. Genet.* (2007). doi:10.1007/s10592-009-9967-0.
- [8] I. Storch, Conservation status and threats to grouse worldwide: an overview, *Wildl. Biol.* 6 (2000) 195–204.
- [9] European Commission, Council Directive 2009/147/CE of 30 November 2009 on the conservation of wild birds, O.J.E.C. L20 (2009) 7–25.
- [10] A. Jacquin, V. Chéret, J.P. Denux, M. Gay, J. Mitchley, P. Xofis, Habitat suitability modelling of Capercaillie (*Tetrao urogallus*) using earth observation data, *J. Nat. Conserv.* 1 (2005) 161–169.
- [11] L. Robles, F. Ballesteros, J. Canut, El urogallo en España, Andorra y Pirineos franceses. Situación actual, SEO/BirdLife, Madrid, 2005.
- [12] Law 42/2007 of 13 December on Natural Heritage and Biodiversity, BOE 299.
- [13] I. Storch, Grouse: Status Survey and Conservation Action Plan 2006–2010, IUCN, Gland, Switzerland and Cambridge UK and World Pheasant Association, Fordingbridge, UK, 2007.
- [14] Y.H. Hsieh, S.C. Sheu, R.C. Bridgman, Development of a monoclonal antibody specific to cooked mammalian meats, *J. Food Prot.* 61 (1998) 476–487, <http://www.biomedcentral.com/pubmed/9709213>.
- [15] D.H. Uebelaker, J.M. Lowenstein, D.G. Hood, Use of solid-phase double-antibody radioimmunoassay to identify species from small skeletal fragments, *J. Forensic Sci.* 49 (2004) 924–929.
- [16] V. Sahajpal, N. Jeelani, S.P. Goyal, M.K. Thakar, Electrophoretic differentiation of protected species based on their sarcoplasmic protein profiles, *Turkish J. Forensic Sci.* 4 (2005) 23–29.
- [17] R. Ogden, Fisheries forensics: the use of DNA tools for improving compliance, traceability and enforcement in the fishing industry, *Fish Fish.* 9 (2008) 462–472.

- [18] S.K. Wasser, W.J. Clark, O. Drori, E.S. Kisamo, C. Mailand, B. Mutayoba, M. Stephens, Combating the illegal trade in African elephant ivory with DNA forensics, *Conserv. Biol.* 22 (2008) 1065–1071.
- [19] I. Lanzillo, F. Burgalassi, S. Fancelli, R. Settimelli, M. Fani, Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis of mitochondrial *cytb* gene from species of dairy interest, *J. AOAC Int.* 88 (2005) 128–135.
- [20] S.K. Gupta, S.K. Verma, L. Singh, Molecular insight into a wildlife crime: the case of a peafowl slaughter, *Forensic Sci. Int.* 154 (2005) 214–217.
- [21] A.R. Gupta, R.C. Patra, D.K. Das, P.K. Gupta, D. Swarup, M. Saini, Sequence characterization and polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism of the mitochondrial DNA 12S rRNA gene provides a method for species identification of Indian deer, *Mitochondrial DNA* 19 (2008) 394–400.
- [22] M.K. Moore, J.A. Bemiss, S.M. Rice, J.M. Quattro, C.M. Woodley, Use of restriction fragment length polymorphisms to identify sea turtle eggs and cooked meats to species, *Conserv. Genet.* 4 (2003) 95–103.
- [23] D.D. Chapman, D.L. Abercrombie, C.J. Douady, E.K. Pikitch, M.J. Stanhope, M.S. Shivji, A streamlined, bi-organellar, multiplex PCR approach to species identification: application to global conservation and trade monitoring of the great white shark, *Carcharodon carcharias*, *Conserv. Genet.* 4 (2003) 415–425.
- [24] P. Yan, X.B. Wu, Y. Shi, C.M. Gu, R.P. Wang, C.L. Wang, Identification of Chinese alligators (*Alligator sinensis*) meat by diagnostic PCR of the mitochondrial cytochrome b gene, *Biol. Conserv.* 121 (2005) 45–51.
- [25] J.J. Dooley, K.E. Paine, S.D. Garrett, H.M. Brown, Detection of meat species using TaqMan real-time PCR assays, *Meat Sci.* 68 (2004) 431–438.
- [26] C. Zhang, M.R. Fowler, N.W. Scott, G. Lawson, A. Slater, A TaqMan real-time PCR system for the identification and quantification of bovine DNA in meats, milks and cheeses, *Food Control* 18 (2007) 1149–1158.
- [27] S. Tanabe, M. Hase, T. Yano, M. Sato, T. Fujimura, H. Akiyama, A real-time quantitative PCR detection method for pork, chicken, beef, mutton, and horseflesh in foods, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 71 (2007) 3131–3135.
- [28] V. Fajardo, I. González, I. Martín, M. Rojas, P.E. Hernández, T. García, R. Martín, Real-time PCR for detection and quantification of red deer (*Cervus elaphus*), fallow deer (*Dama dama*), and roe deer (*Capreolus capreolus*) in meat mixtures, *Meat Sci.* 79 (2008) 289–298.
- [29] R. Köppl, F. Zimmerli, A. Breitenmoser, Heptaplex real-time PCR for the identification and quantification of DNA from beef, pork, chicken, turkey, horse meat, sheep (mutton) and goat, *Eur. Food Res. Technol.* 230 (2009) 125–133.
- [30] M. Rojas, I. González, M.A. Pavón, N. Pegels, A. Lago, P.E. Hernández, T. García, R. Martín, Novel TaqMan real-time polymerase chain reaction assay for verifying the authenticity of meat and commercial meat products from game birds, *Food Addit. Contam.* 27 (2010) 749–763.
- [31] O. Berry, S.D. Sarre, Gel-free species identification using melt-curve analysis, *Mol. Ecol. Notes* 7 (2007) 1–4.
- [32] H.J. Aaris, M. Bouwel, J.B. Bunjer, J.A. Lenstra, L.W. Van Raamsdonk, Detection of bovine meat and bone meal in animal feed at a level of 0.1%, *J. AOAC Int.* 89 (2006) 1443–1446.
- [33] M. Kubista, J.M. Andrade, M. Bengtsson, A. Forootan, J. Jonás, K. Lind, R. Sindelka, R. Sjöback, B. Sjögreen, L. Strömberg, A. Stahlberg, N. Zoric, The real-time polymerase chain reaction, *Mol. Aspects Med.* 27 (2006) 95–129.
- [34] S.G. Houghton, F.R. Cockerill, Real-time PCR: overview and applications, *Surgery* 139 (2006) 1–5.
- [35] M. Rojas, I. González, V. Fajardo, I. Martín, P.E. Hernández, T. García, R. Martín, Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism authentication of raw meats from game birds, *J. AOAC Int.* 91 (2008) 1416–1422.
- [36] V. Fajardo, I. González, I. López-Calleja, I. Martín, P.E. Hernández, T. García, R. Martín, PCR-RFLP authentication of meats from red deer (*Cervus elaphus*), fallow deer (*Dama dama*), roe deer (*Capreolus capreolus*), cattle (*Bos taurus*), sheep (*Ovis aries*), and goat (*Capra hircus*), *J. Agric. Food Chem.* 54 (2006) 1144–1150.
- [37] V. Fajardo, I. González, I. Martín, M. Rojas, P.E. Hernández, T. García, R. Martín, A LightCycler TaqMan PCR assay for quantitative detection of chamois (*Rupicapra rupicapra*) and pyrenean ibex (*Capra pyrenaica*) in experimental meat mixtures, *Int. J. Food Sci. Technol.* 44 (2009) 1997–2004.
- [38] R. Ogden, N. Dawney, R. McEwing, Wildlife DNA forensics bridging the gap between conservation genetics and law enforcement, *Endanger. Species Res.* 9 (2009) 179–195.
- [39] M.A. Rodríguez, T. García, I. González, P.E. Hernández, R. Martín, TaqMan real-time PCR for the detection and quantification of pork in meat mixtures, *Meat Sci.* 70 (2005) 113–120.
- [40] J. Sawyer, C. Wood, D. Shanahan, S. Gout, D. McDowell, Real-time PCR for quantitative meat species testing, *Food Control* 14 (2003) 579–583.
- [41] S. Colgan, L. O'Brien, M. Maher, N. Shilton, K. McDonnell, S. Ward, Development of a DNA-based assay for species identification in meat and bone meal, *Food Res. Int.* 34 (2001) 409–414.
- [42] D. Frezza, M. Favaro, G. Vaccari, C. Von-Holst, V. Giambra, E. Anklam, D. Bove, P.A. Battaglia, U. Agrimi, G. Brambilla, P. Ajmone-Marsan, M. Tartaglia, A competitive polymerase chain reaction-based approach for the identification and semiquantification of mitochondrial DNA in differently heat-treated bovine meat and bone meal, *J. Food Prot.* 66 (2003) 103–109.
- [43] H. Hird, J. Chisholm, A. Sánchez, M. Hernández, R. Goodier, K. Schneede, Effect of heat and pressure processing on DNA fragmentation and implications for the detection of meat using a real-time polymerase chain reaction, *Food Addit. Contam.* 23 (2006) 645–650.
- [44] S. Regnaut, F.S. Lucas, L. Fumagalli, DNA degradation in avian faecal samples and feasibility of non-invasive genetic studies of threatened capercaillie populations, *Conserv. Genet.* 7 (2006) 449–453.
- [45] R. Rodríguez-Muñoz, P.M. Mirol, G. Segelbacher, A. Fernández, T. Tregenza, Genetic differentiation of an endangered capercaillie (*Tetrao urogallus*) population at the Southern edge of the species range, *Conserv. Genet.* 8 (2007) 659–670.
- [46] O. Duriez, J.M. Sachet, E. Ménéni, N. Pidancier, C. Miquel, P. Taberlet, Phylogeography of the capercaillie in Eurasia: what is the conservation status in the Pyrenees and Cantabrian Mountains? *Conserv. Genet.* 8 (2007) 513–526.
- [47] G. Jacob, R. Debrunner, F. Gugerli, B. Schmid, K. Bollmann, Field surveys of capercaillie (*Tetrao urogallus*) in the Swiss Alps underestimated local abundance of the species as revealed by genetic analyses of non-invasive samples, *Conserv. Genet.* 11 (2010) 33–44.
- [48] M. Rojas, I. González, V. Fajardo, I. Martín, P.E. Hernández, T. García, R. Martín, Identification of raw and heat-processed meats from game bird species by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism of the mitochondrial D-loop region, *Poult. Sci.* 88 (2009) 669–679.
- [49] P.S. Girish, A.S.R. Anjaneyulu, K.N. Viswas, B.M. Shivakumar, M. Anand, M. Patel, B. Sharma, Meat species identification by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) of mitochondrial 12S rRNA gene, *Meat Sci.* 70 (2005) 107–112.





Contents lists available at ScienceDirect

Food Control

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/foodcont](http://www.elsevier.com/locate/foodcont)

## Authentication of meat and commercial meat products from common pigeon (*Columba livia*) woodpigeon (*Columba palumbus*) and stock pigeon (*Columba oenas*) using a TaqMan<sup>®</sup> real-time PCR assay

María Rojas, Isabel González, Teresa García, Pablo E. Hernández, Rosario Martín\*

Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense, 28040 Madrid, Spain

### ARTICLE INFO

**Article history:**  
Received 22 February 2011  
Received in revised form  
20 July 2011  
Accepted 26 July 2011

**Keywords:**  
Species identification  
12S rRNA  
18S rRNA  
Pigeon  
Real-time PCR  
TaqMan<sup>®</sup>

### ABSTRACT

A species-specific real-time polymerase chain reaction (PCR) assay using TaqMan<sup>®</sup> probes has been developed for the identification of meat and meat products from common pigeon (*Columba livia*), woodpigeon (*Columba palumbus*) and stock pigeon (*Columba oenas*). The method combines the use of species-specific primers and TaqMan<sup>®</sup> probes that amplify small fragments (amplicons < 200 base pairs) of the mitochondrial 12S rRNA gene, and an endogenous control primer pair that amplifies a 141 bp fragment of the nuclear 18S rRNA gene from eukaryotic DNA. Analysis of experimental raw and heat-treated binary mixtures as well as of commercial meat products from the target species, demonstrated the suitability of the assay for the detection of the target DNAs. The PCR assay reported in this work could be useful in inspection programs to verify the correct labelling of raw and heat-treated pigeon meat products.

© 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

The identification of animal species in meat products is becoming a very important issue for the assessment of food composition and the provision of proper consumer information. Consumers require clear and accurate information in order to make informed choices about the products they purchase (Stamoulis, Stamatis, Sarafidou, & Mamuris, 2010). Following the European Union labelling regulations, meat products should be accurately labelled regarding their species content (European Commission, 2001). However, the fraudulent mislabelling of meat is a widespread problem, particularly with high added-value meat species commanding a premium price (Woolfe & Primrose, 2004). To ensure adherence to regulations, and to enforce punitive measures when needed, robust analytical tests for meat species identification are required. The application of these methods in food regulatory control should facilitate the determination of adulterated and undeclared species compositions, would protect both consumers and producers from frauds, and also would help to avoid possible illegal sale of meat from protected species (Peter, Brunen-Nieweler, Cammann, & Borchers, 2004).

In the last few years, as a result of the increasing consumers' concern about healthy and safe products, there has been a growing interest in meat from alternative animal species. A particular type of meat which is gaining popularity among European consumers is pigeon meat (Pomianowski et al., 2009). Among the pigeon species distributed in Europe for human consumption, the common pigeon (*Columba livia*) is the most widely extended, with a great number of farms breeding this species for the production of meat and meat products. The other pigeon species commercialized in Europe are the woodpigeon (*Columba palumbus*) and the stock pigeon (*Columba oenas*) which meat comes mainly from the hunting activity, being less abundant than common pigeon meat and commanding higher prices. The steadily growing demand for pigeon meat and meat products as well as the high prices that consumers are ready to pay for them could lead to fraudulent practices of pigeon meat substitution. Moreover, since the price of common pigeon meat is lower than the price of woodpigeon and stock pigeon, meat from common pigeon could be indiscriminately used in products labelled as woodpigeon or stock pigeon, resulting in large profits for manufacturers and suppliers. Considering these aspects, the development of rapid and accurate methods for the identification of pigeon species is highly needed not only to detect fraudulent practices involving the replacement of pigeon meat for other less valuable species, but also to avoid fraudulent substitution among different pigeon species.

\* Corresponding author. Tel.: +34 913943752; fax: +34 913943743.  
E-mail addresses: [rmartins@vet.ucm.es](mailto:rmartins@vet.ucm.es), [rosamart@vet.ucm.es](mailto:rosamart@vet.ucm.es) (R. Martín).

Currently, a range of analytical methods has been developed to identify the animal origin of food products. Several methods that rely on protein analysis have been described, including electrophoretic, immunological, chromatographic, and mass-spectrometric techniques. However, although the species of origin in raw meats can be identified by using most of these protein-based methods, they are significantly less sensitive in the evaluation of thermally processed foods because of specific epitopes alterations (Soares, Amaral, Mafra, & Oliveira, 2010). In the past decades, DNA has replaced protein in species identification methods due to its stability at high temperatures and to the fact that its structure is conserved within all cells of an individual. In particular, the introduction of polymerase chain reaction (PCR) in food analysis has provided a vast range of techniques for rapid detection and identification of organisms at species and intraspecies level. PCR-based techniques most frequently used for meat species identification include PCR-nucleotide sequencing (Girish et al., 2004), PCR-RFLP (Prado, Calo-Mata, Villa, Cepeda, & Barros-Velázquez, 2007), or PCR with species-specific primers (Che Man, Aida, Raha, & Son, 2007). More recent reports have focused on the use of specific primers in real-time PCR (Köppel, Zimmerli, & Breitenmoser, 2009; Zhang, Fowler, Scott, Lawson, & Slater, 2007). In the real-time PCR technique, amplification of the target gene is monitored by an increased fluorescence signal which enables direct assessment of the results after the PCR application. The use of fluorescence for detection purposes eliminates the need for gel electrophoresis in post-PCR processing steps, reduces the carry-over contamination risk, and facilitates large-scale sample processing (Kesmen, Gulluce, Sahin, & Yetim, 2009).

In this paper, we describe the development of a real-time PCR approach for the detection of pigeon species (*Columba* spp.) and the specific identification of common pigeon (*C. livia*), woodpigeon (*C. palumbus*), and stock pigeon (*C. oenas*) DNAs in raw and heat-treated meat mixtures, and commercial meat products using TaqMan® fluorogenic probes as detection platform. The assay targets species-specific sequences on the 12S rRNA gene and makes use of a eukaryotic system based on an 18S rRNA fragment as endogenous control.

## 2. Material and methods

### 2.1. Selection and preparation of meat samples

Authentic muscle samples of common pigeon (*C. livia*) were purchased from Industria del Pichón Bravío (Valladolid, Spain) and Hermanos Saiz (Madrid, Spain). Woodpigeon (*C. palumbus*) meat samples were provided by Antonio de Miguel (Madrid, Spain). Stock pigeon (*C. oenas*) samples were obtained from the Centro de Recuperación de Fauna y Educación Ambiental de Navas del Rey (Madrid, Spain). Quail (*Coturnix coturnix*), pheasant (*Phasianus colchicus*), red-legged partridge (*Alectoris rufa*), chukar partridge (*Alectoris chukar*), guinea fowl (*Numida meleagris*), Eurasian woodcock (*Scolopax rusticola*), song thrush (*Turdus philomelos*), ostrich (*Struthio camelus*), chicken (*Gallus gallus*), turkey (*Meleagris gallopavo*), Muscovy duck (*Cairina moschata*), goose (*Anser anser*), cattle (*Bos taurus*), sheep (*Ovis aries*), goat (*Capra hircus*), and swine (*Sus scrofa domestica*) meat samples were obtained from different sources (Rojas et al., 2009a). All specimens were morphologically identified by professional veterinaries before obtaining the samples. Fresh muscle portions from the selected specimens were processed immediately or stored frozen at  $-20^{\circ}\text{C}$  until use.

Binary mixtures of common pigeon, woodpigeon, or stock pigeon, in a chicken meat matrix were prepared using raw muscles from the selected species. For each meat mixture, five different percentages containing 50%, 25%, 10%, 5%, 1%, and 0.1% (wt/wt) of the target species were prepared to a final weight of 100 g. Forty ml

of sterile phosphate-buffered saline (PBS; 136 mM NaCl, 1.4 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 8.09 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ , and 2.6 mM KCl, pH 7.2) were added to the binary mixtures and they were homogenized with a blender (Sunbeam Oster, Florida, USA). Fifty grams of each mixture were sterilized at  $121^{\circ}\text{C}$  for 20 min to check the effect of thermal treatments on the technique's ability to identify the target species. Raw and sterilized binary meat mixtures were processed directly or stored frozen at  $-20^{\circ}\text{C}$  until use.

In addition, several commercial meat products labelled as pigeon, including raw meat, pickles, stews, pâtés, and mousses of different brands, were purchased from different retail markets (Spain).

Total DNA was extracted from meat following a previously described procedure (Rojas et al., 2008). DNA concentration was measured with a NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop Technologies Inc., Montchanin, DE).

### 2.2. Primers and oligonucleotide probes design

The species-specific primers used for PCR amplification were designed based on the alignment and comparison of woodpigeon, quail, pheasant, red-legged partridge, chukar partridge, barbara partridge, guinea fowl, Eurasian woodcock, song thrush, chicken, turkey, Muscovy duck, and goose 12S rRNA sequences obtained previously (Rojas et al., 2009a). On the other hand, 12S-FW and 12S-REV oligonucleotides designed by Fajardo et al. (2006) were used for the amplification, purification and sequencing of an approximately 720 bp conserved fragment of the 12S rRNA gene from common pigeon and stock pigeon species following the procedure described by Rojas et al. (2008). The 12S rRNA gene sequences obtained from common pigeon (FN675577) and stock pigeon (FN675565) were also included in the alignment. Based upon detailed analysis and comparison of the aligned 12S rRNA sequences, four species-specific primer pairs were designed: 12SPigeon-Fw/12SPigeon-Rev, 12SComPig-Fw/12SComPig-Rev, 12SWoodPig-Fw/12SWoodPig-Rev, and 12SStockPig-Fw/12SStockPig-Rev. 12SPigeon-Fw/12SPigeon-Rev primers were designed for the amplification of a common fragment of approximately 148 bp from the 12S rRNA gene of pigeon species (common pigeon, woodpigeon, and stock pigeon), whereas 12SComPig-Fw/12SComPig-Rev, 12SWoodPig-Fw/12SWoodPig-Rev, and 12SStockPig-Fw/12SStockPig-Rev primers were expected to yield specific fragments of 174, 128, and 121 bp in the 12S rRNA gene of common pigeon, woodpigeon, and stock pigeon, respectively. Besides, 18SpEu-Dir and 18SpEu-Inv primers based on conserved 18S rRNA gene sequences available in the Genbank/EMBL database for various avian and mammal species were used as positive control of the PCR assay. These primers were expected to amplify a conserved fragment of 141 bp from the 18S rRNA gene in all the analyzed species.

The EMMA program included in the EMBOSS software package version 2.0 and Primer Express 2.0 software (Perkin-Elmer/Applied Biosystems Division, Foster City, CA) were used for sequence alignment and primer design.

To accomplish the detection procedure, specific fluorescent hybridisation TaqMan® probes for pigeon (Pigeon-TM), common pigeon (ComPig-TM), woodpigeon (WoodPig-TM), and stock pigeon (StockPig-TM) were used. Besides, another TaqMan® probe (18SProbe) based on conserved 18S rRNA gene sequences available in the Genbank/EMBL database for various avian and mammal species was used together with 18SpEu-Dir and 18SpEu-Inv primers as positive control PCR system. TaqMan® probes were designed and synthesized by TibMolBiol (Berlin, Germany). The TaqMan® probes were aimed to anneal within the gene fragment generated by amplification of the corresponding target and were labelled on the 5' end with the fluorescent reporter dye 6-carboxyfluorescein



(FAM) and on the 3' end with the blackberry (BBQ) fluorescent quencher.

In addition, species-specific primers developed in previous works for chicken, duck, cattle, and pig (Martín, García, Fajardo, López-Calleja, Hernández et al., 2007; Martín, García, Fajardo, López-Calleja, Rojas, Hernández et al., 2007; Martín, García, Fajardo, López-Calleja, Rojas, Pavón et al., 2007; Martín et al., 2008), were used in conventional PCR assays for the analysis of complex meat products from pigeon in order to verify the composition stated in the labels.

The sequences and description of the primers and probes used in this work are summarized in Table 1.

### 2.3. PCR conditions

Real-time PCR was run under generic cycling conditions. To determine the optimal quantity of primers, preliminary tests were performed using equimolar primer concentrations (50 nM, 300 nM, and 900 nM). The concentrations of primers yielding the highest endpoint fluorescence and the lowest  $C_p$  (data not shown) were 900 nM of forward primer and 900 nM of reverse primer for all the pigeon-specific systems. The positive control system used 300 nM of forward primer (18SpEu-Dir) and 900 nM of reverse primer (18SpEu-Inv). The PCR reactions were carried out using the LightCycler® TaqMan® Master (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany), 2 pmol of each TaqMan® probe (TibMolBiol), and 5 ng of DNA. Amplification reactions were performed in a total reaction volume of 10 µL in a glass capillary tube and were run on the LightCycler® 2.0 Instrument (Roche Applied Science, Pörsching, Germany) with the following program: 10 min at 95 °C (denaturation and Taq polymerase activation), an amplification program of 40 cycles at 95 °C for 10 s, 63 °C (for pigeon) or 65 °C (for common pigeon, woodpigeon, and stock pigeon) for 30 s, and 72 °C for 1 s. Samples were then cooled to 40 °C for 30 s. The same program was used to amplify each of the species-specific systems along with the positive control PCR fragment. The crossing point value ( $C_p$ ), which refers to the cycle number where the sample's fluorescence significantly increases above the background level of fluorescence, was calculated automatically by the LightCycler® software as the first maximum of the second derivative of the curve. Unless

otherwise indicated, all real-time PCR reactions were carried out in duplicate.

### 2.4. Construction of standard curves and data analysis

In order to check the ability of the real-time PCR method for quantitative detection, standard curves were constructed using different percentages (50, 25, 10, 5, 1, and 0.1%) of raw and sterilized binary meat mixtures from common pigeon, woodpigeon, and stock pigeon.

$C_p$  values obtained from each sample with the corresponding species-specific system ( $C_{pSP}$ ) were normalized according to the following equation:

$$C_{pSPS} = C_{pEU} * C_{pSP} / C_{pEUS}$$

where  $C_{pSPS}$  is the normalized  $C_p$  value of the sample analyzed with the corresponding specific PCR system,  $C_{pEU}$  is the  $C_p$  average value of the standard samples (binary mixtures) in the endogenous PCR system, and  $C_{pEUS}$  is the  $C_p$  value of the sample analyzed with the endogenous PCR system.

In quantification analysis, a standard curve of standard samples plotted against their crossing point is used to determine the concentration of unknown samples. The amount of target DNA in an unknown sample can be measured by interpolation of the normalized  $C_p$  value obtained in the unknown sample in the corresponding standard curve of  $C_p$  values generated from known DNA percentages of the target species.

Besides, the correlation between the variables, crossing point ( $C_p$ ) and concentration ([ ]) is semilogarithmic:

$$C_p = b \log [ ] + a$$

Where  $b$  is the slope and  $a$  is the intercept.

Linearity test, sensitivity, accuracy and precision parameters of the species-specific real-time PCR systems were evaluated according to previously described methods (Camacho, Torres, Gil-Alegre, Obregón, & Ruz, 1993; ICH Harmonized Tripartite Guideline., 2005). To carry out the validation of the real-time PCR technique developed in this work, three separate DNA extractions of each mixture percentage were assayed in different days, using two replicates of each sample.

**Table 1**  
DNA sequences of the primers and probes used in this study.

Primers and probes	Length (bp)	Sequence (5' to 3')	Description
18SpEu-Dir	29	GGTAGTGACGAAAAATAACAATACAGGAC	Positive control forward primer
18SpEu-Inv	25	ATACGCTATTGGAGCTGGAATTACC	Positive control reverse primer
18SProbe	29	FAM-AAGTGGACTCATTCCAATTACAGGGCCXT-BBQ	Positive control probe
12SPigeon-Fw	23	AAGATGCATTAAACCCGCCCTA	Pigeon forward primer
12SPigeon-Rev	23	CAGGCGGATGCTTTGGTTATATA	Pigeon reverse primer
Pigeon-TM	27	FAM-AATGAACCTCCAGAAAGCCAGGGYACA-BBQ	Pigeon probe
12SComPig-Fw	21	CGACCACTTCTGCCATGGAC	Common pigeon forward primer
12SComPig-Rev	25	CCCTTTTCGTGGGATTTCCTAGATT	Common pigeon reverse primer
ComPig-TM	30	FAM-CCCCTAACAAGACAGGTCAAGGTATGCT-BBQ	Common pigeon probe
12SWoodPig-Fw	24	AGAGTGGACTCATGCTTATCGCAT	Woodpigeon forward primer
12SWoodPig-Rev	26	CTTTCGTGGAGTTCATTGAGTCGTAT	Woodpigeon reverse primer
WoodPig-TM	28	FAM-AGCTTAAGGTGCACTTAAACCCCTTAA-BBQ	Woodpigeon probe
12SStockPig-Fw	22	AAAGCGGGATAACATAAGCCCT	Stock pigeon forward primer
12SStockPig-Rev	26	CTTACTCATCTTTAGCAAGTTGGAA	Stock pigeon reverse primer
Stock-TM	18	FAM-CACCCTCTCATAAGCTC-BBQ	Stock pigeon probe
12SpChicken-Dir	26	ACATAGAACAAACGAAAAAGGATGTG	Chicken forward primer
12SpChicken-Inv	23	CGTCTTAAAGTGAGCTTAGGGCG	Chicken reverse primer
12SDucks-Dir	24	CATAATTAATACCTGTAATGCC	Duck forward primer
12S-Rev	24	TCCGTACACTTACCTGTGACGACTT	Duck reverse primer
12SpVaca-Dir	27	TTAGTGAATTAGGCCATGAAGCA	Cattle forward primer
12SpVaca-Inv	29	GTTTAAATAGGGTTAAGATGCACTCAATC	Cattle reverse primer
12SCerd-Dir	18	CCTCCTCAAGCATGTAGT	Swine forward primer
12SCerd-Inv	23	GTTACGACTTGTCTCTCGTGCA	Swine reverse primer

### 3. Results and discussion

#### 3.1. Real-time PCR system set-up

The primary objective of the PCR system setup was to establish an adequate marker for pigeon species identification. As target for real-time PCR, a fragment of the mitochondrial 12S rRNA gene was selected. This mitochondrial gene was chosen due to its adequate length and grade of mutation between related species. In addition, the use of a conserved region in the nuclear 18S rRNA gene provided a positive control of the total PCR-amplifiable eukaryotic DNA present in the sample. The use of such positive control is important to avoid false-negative results due to factors affecting amplification such as DNA degradation, expired reagents, or presence of nucleic acid inhibitors.

To develop a robust method for detection of common pigeon, woodpigeon, and stock pigeon species in meat and commercial meat products, four species-specific primers and a eukaryotic primer set (positive control) were combined in a real-time PCR method. Specific fluorescently labelled TaqMan® probes were used to accomplish the detection of the target genes.

#### 3.2. Specificity

Each species-specific PCR system was tested for its selectivity and cross reactivity by analysis of DNAs obtained from different game and domestic meat species. All species were analyzed in duplicate (two separate extractions and PCR reactions from each species).

The pigeon-specific system amplified a 148 bp fragment from common pigeon ( $C_p$  value of  $16.97 \pm 0.17$ ), woodpigeon ( $17.66 \pm 0.10$ ), and stock pigeon ( $18.35 \pm 0.14$ ) raw meat samples. Similarly, common pigeon, woodpigeon, and stock pigeon specific

systems amplified fragments of 174, 128, and 121 bp, respectively, from raw meat samples of each corresponding target species with  $C_p$  values of  $17.27 \pm 0.15$  in common pigeon,  $16.77 \pm 0.02$  in woodpigeon, and  $21.39 \pm 0.14$  in stock pigeon. A  $C_p$  value of 40.00 was measured when DNA from other wild and domestic meat species was tested which means that no amplification signal was detected after 40 cycles. The positive control system amplified a 141 bp fragment from all the eukaryotic species analyzed. With this system, all tested species showed  $C_p$  values between  $17.86 \pm 0.13$  and  $21.06 \pm 0.15$ .

#### 3.3. Efficiency and quantification limit

The efficiency and quantification limit of the real-time PCR assay developed were evaluated from the standard curve made with the experimental binary mixtures containing 50%, 25%, 10%, 5%, 1%, and 0.1% of either common pigeon, woodpigeon, or stock pigeon meat in a chicken meat matrix. Five ng of DNA from each binary mixture percentage was analyzed with the corresponding species-specific system and with the positive control system. Binary mixtures of common pigeon in chicken were used in the assay with pigeon-specific primers (12SPigeon-Fw/12SPigeon-Rev). Results of the efficiency of the PCR approach for raw experimental binary mixtures are shown in Fig. 1. As can be seen, the slope value of log input amount vs.  $\Delta C_p$  for all the specific systems is near to  $-3.32$  which corresponds to a 100% PCR efficiency. Similarly, Fig. 2 shows the results obtained after analyzing the sterilized experimental mixtures.

The theoretical detection limit for each species-specific PCR system was estimated from the standard curves obtained with the experimental binary mixtures shown in Figs. 1 and 2 as the DNA amount yielding a  $C_p$  value of 40.00. This value was  $8.21 \times 10^{-7}$  ng in pigeon,  $1.85 \times 10^{-6}$  ng in common pigeon,  $2.14 \times 10^{-7}$  ng in woodpigeon, and  $2.1 \times 10^{-5}$  ng in stock pigeon, which corresponds

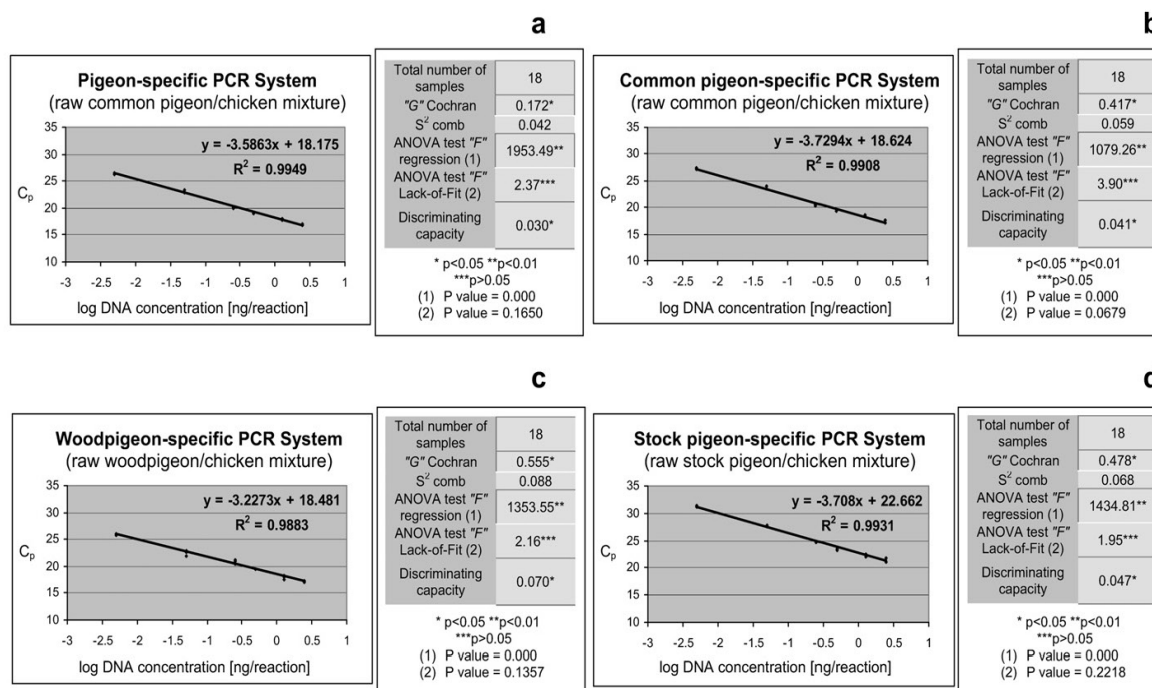
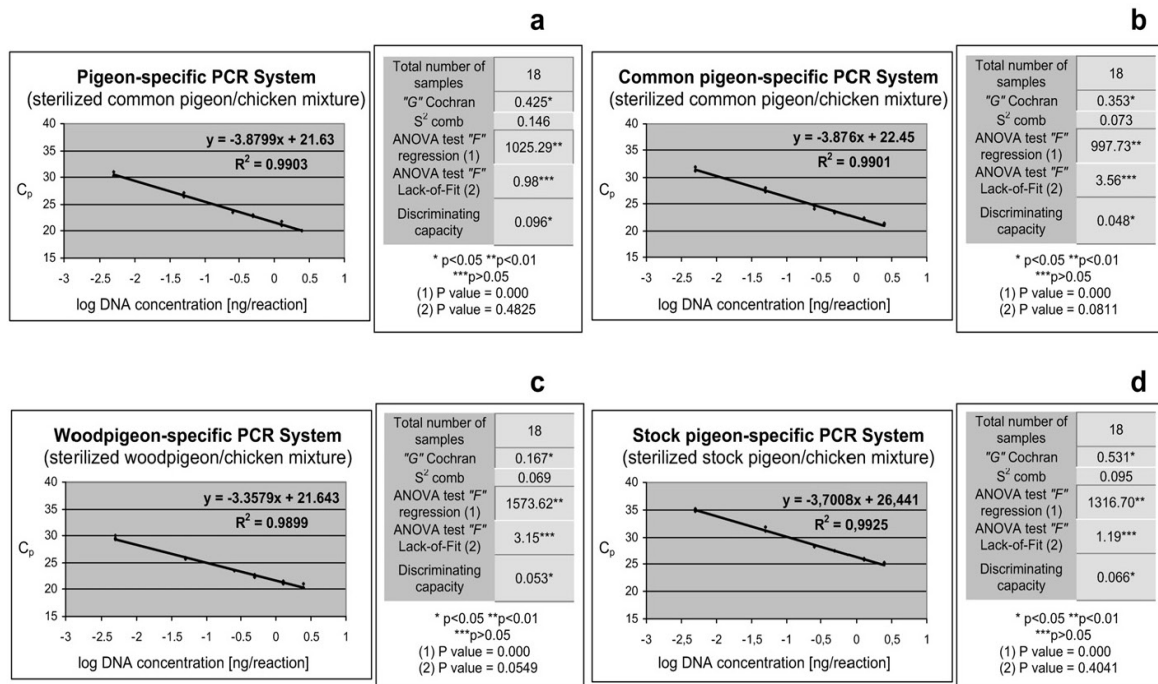


Fig. 1. Normalized  $C_p$  values from raw meat mixtures of common pigeon (1a, 1b), woodpigeon (1c), and stock pigeon (1d) in chicken, plotted versus the logarithm of the DNA concentrations. Linearity test, regression line and sensitivity parameters are calculated for each species-specific PCR system. Three different DNA extractions performed on different percentages (50, 25, 10, 5, 1 and 0.1%) of common pigeon, woodpigeon, and stock pigeon species in the raw meat mixtures were used as standards.





**Fig. 2.** Normalized  $C_p$  values from sterilized meat mixtures of common pigeon (2a, 2b), woodpigeon (2c), and stock pigeon (2d) in chicken, plotted versus the logarithm of the DNA concentrations. Linearity test, regression line and sensitivity parameters are calculated for each species-specific PCR system. Three different DNA extractions performed on different percentages (50, 25, 10, 5, 1 and 0.1%) of common pigeon, woodpigeon, and stock pigeon species in the sterilized meat mixtures were used as standards.

to 0.000016%, 0.000037%, 0.0000043%, and 0.00042% of pigeon, common pigeon, woodpigeon, and stock pigeon DNA in a mixture, respectively, if 5 ng of total DNA are used in the assay. On the other hand, in sterilized binary mixtures, the theoretical detection limits of the specific PCR systems were  $1.84 \times 10^{-5}$  ng in pigeon,  $2.96 \times 10^{-5}$  ng in common pigeon,  $3.41 \times 10^{-6}$  ng in woodpigeon, and  $2.1 \times 10^{-4}$  ng in stock pigeon, which corresponds to 0.00037%, 0.00059%, 0.00068%, and 0.0043% of pigeon, common pigeon, woodpigeon, and stock pigeon DNA in a mixture, respectively, if 5 ng of total DNA are used in the assay. It should be noted that although sterilization (121 °C for 20 min) reduces the amount of detectable DNA, positive signals were also observed in thermally treated samples containing small percentages of the target species DNA. It is widely reported that the intensity of the heating and pressure of food processing treatments such as sterilization clearly affects DNA fragmentation and can lead to false-negative results (Hird et al., 2006). In the present work, the length of the amplified DNA fragments (<200 bp) minimized sensitivity to degraded DNA templates.

It can be deduced from the results obtained that the real-time PCR method developed allows quantification of minute amounts of DNA as long as the reference sample used has received the same treatment than the samples analyzed. So, because of the variations found in the amount and quality of amplifiable DNA in the real-time PCR assay developed, different calibration curves should be used in accordance with the target species, the tissue matrix and the heat treatment applied in order to achieve reliable quantification of target meat content.

#### 3.4. Sensitivity and linearity

Normalized  $C_p$  values obtained from the raw and heat-treated meat mixtures of common pigeon, woodpigeon, and stock pigeon

in chicken, versus the logarithm of the DNA concentrations, were used to test the sensitivity of the real-time PCR method. Figs. 1 and 2 show the discriminating capacity, which is the least difference in logarithm of target DNA concentration in the mixture that the analytical method can discriminate with a significant level. Linearity of the pigeon, common pigeon, woodpigeon, and stock pigeon real-time PCR response was also analyzed for each experimental raw and heat-treated binary mixture. In each case, the following parameters were evaluated: (a) Cochran's test, which determined whether the variances of the responses obtained for each concentration of pigeon, common pigeon, woodpigeon, and stock pigeon DNA in the mixtures (raw and heat-treated) were homogeneous, (b) regression analysis, and (c) variance analysis with Lack-of-Fit. The results are also summarized in Figs. 1 and 2.

#### 3.5. Accuracy and precision

The accuracy of the assay was determined from three meat percentages (25%, 10%, and 1%) of each raw and heat-treated binary mixture. Accuracy is reported as percentage recovery by the assay of known added amounts of analyte. Using the Snedecor F-test, it was verified that the concentration of DNA present in a sample did not affect the variation of the results. The values of the Student's *t*-test obtained demonstrated that the method was accurate, since no significant differences between 100% and the mean recovery values were detected.

The influence of the day of analysis on the precision of the assay was also tested by comparing the coefficients of variation (CV) of three separate DNA extractions performed on the 1% raw and sterilized binary mixtures, analyzed in duplicate three times on the same day, versus the values obtained for the same samples on three different days. Results showed significant differences with higher CV values when the assay was done on different days with respect

**Table 2**

Results of the analysis of raw and heat-treated commercial meat products from pigeon using pigeon, common pigeon, woodpigeon, and stock pigeon specific primers in real-time PCR and chicken, duck, bovine, and pig primers in conventional PCR.

Type of product	Pigeon species stated in the label	Pigeon specific PCR system	Common pigeon specific PCR system	Woodpigeon specific PCR system	Stock pigeon specific PCR system	Positive control PCR system	Other species detected according to the label description
Raw meat A	Pigeon	16.99 ± 0.11	17.56 ± 0.15	40.00	40.00	19.58 ± 0.11	— <sup>a</sup>
Raw meat B	Pigeon	16.87 ± 0.21	17.76 ± 0.17	40.00	40.00	19.32 ± 0.15	—
Raw meat C	Common pigeon	16.35 ± 0.14	17.54 ± 0.12	40.00	40.00	19.00 ± 0.14	—
Raw meat D	Common pigeon	17.03 ± 0.02	17.91 ± 0.21	40.00	40.00	19.22 ± 0.07	—
Raw meat E	Common pigeon	16.78 ± 0.12	17.52 ± 0.14	40.00	40.00	20.02 ± 0.06	—
Raw meat F	Common pigeon	16.79 ± 0.17	17.87 ± 0.09	40.00	40.00	19.87 ± 0.13	—
Raw meat G	Common pigeon	16.94 ± 0.22	17.89 ± 0.26	40.00	40.00	20.11 ± 0.07	—
Raw meat H	Common pigeon	16.86 ± 0.16	17.72 ± 0.22	40.00	40.00	20.04 ± 0.14	—
Raw meat I	Common pigeon	16.52 ± 0.16	17.45 ± 0.17	40.00	40.00	19.78 ± 0.13	—
Raw meat J	Common pigeon	17.15 ± 0.18	17.26 ± 0.17	40.00	40.00	19.81 ± 0.17	—
Raw meat K	Common pigeon	17.18 ± 0.11	17.35 ± 0.07	40.00	40.00	19.63 ± 0.12	—
Raw meat L	Common pigeon	16.88 ± 0.25	17.37 ± 0.11	40.00	40.00	20.23 ± 0.11	—
Raw meat M	Stock pigeon	16.91 ± 0.21	17.56 ± 0.12	40.00	40.00	20.15 ± 0.09	—
Raw meat N	Stock pigeon	17.34 ± 0.19	17.76 ± 0.23	40.00	40.00	19.65 ± 0.05	—
Raw meat O	Stock pigeon	16.67 ± 0.08	17.78 ± 0.12	40.00	40.00	19.73 ± 0.12	—
Raw meat P	Stock pigeon	16.97 ± 0.17	17.82 ± 0.21	40.00	40.00	19.25 ± 0.21	—
Raw meat Q	Stock pigeon	17.14 ± 0.15	17.41 ± 0.19	40.00	40.00	19.92 ± 0.17	—
Raw meat R	Stock pigeon	17.25 ± 0.08	17.50 ± 0.18	40.00	40.00	19.62 ± 0.24	—
Raw meat S	Stock pigeon	16.83 ± 0.26	17.63 ± 0.20	40.00	40.00	19.83 ± 0.27	—
Raw meat T	Stock pigeon	16.56 ± 0.13	17.65 ± 0.26	40.00	40.00	20.30 ± 0.15	—
Raw meat U	Stock pigeon	16.64 ± 0.17	17.46 ± 0.09	40.00	40.00	20.16 ± 0.19	—
Raw meat V	Stock pigeon	17.32 ± 0.24	17.79 ± 0.13	40.00	40.00	20.06 ± 0.19	—
Pickled meat A	Common pigeon	21.45 ± 0.27	23.35 ± 0.21	40.00	40.00	28.24 ± 0.22	—
Pickled meat B	Common pigeon	24.08 ± 0.11	26.24 ± 0.17	40.00	40.00	29.62 ± 0.21	—
Pickled meat C	Common pigeon	22.35 ± 0.15	24.57 ± 0.18	40.00	40.00	28.44 ± 0.17	—
Pickled meat D	Common pigeon	23.05 ± 0.24	24.65 ± 0.21	40.00	40.00	29.02 ± 0.21	—
Pickled meat E	Pigeon	21.48 ± 0.09	24.18 ± 0.16	40.00	40.00	25.21 ± 0.13	—
Pickled meat F	Pigeon	28.62 ± 0.22	31.09 ± 0.24	40.00	40.00	26.13 ± 0.19	—
Pickled meat G	Common pigeon	25.01 ± 0.26	29.49 ± 0.14	40.00	40.00	28.47 ± 0.22	—
Pickled meat H	Common pigeon	24.36 ± 0.19	29.06 ± 0.14	40.00	40.00	28.28 ± 0.21	—
Pickled meat I	Common pigeon	25.45 ± 0.18	31.32 ± 0.28	40.00	40.00	29.86 ± 0.17	—
Pickled meat J	Common pigeon	23.08 ± 0.27	31.13 ± 0.09	40.00	40.00	30.17 ± 0.12	—
Pickled meat K	Common pigeon	25.25 ± 0.08	22.11 ± 0.27	40.00	40.00	18.11 ± 0.14	—
Pickled meat L	Common pigeon	21.14 ± 0.15	22.15 ± 0.16	40.00	40.00	18.16 ± 0.09	—
Pickled meat M	Common pigeon	23.67 ± 0.15	26.64 ± 0.18	40.00	40.00	23.12 ± 0.18	—
Pickled meat N	Common pigeon	26.32 ± 0.19	29.98 ± 0.19	40.00	40.00	30.28 ± 0.15	—
Pickled meat O	Common pigeon	20.01 ± 0.18	23.89 ± 0.25	40.00	40.00	24.18 ± 0.21	—
Pickled meat P	Stock pigeon	22.75 ± 0.29	25.52 ± 0.22	40.00	40.00	26.37 ± 0.10	—
Boned pickled meat A	Pigeon	25.22 ± 0.12	27.63 ± 0.27	40.00	40.00	24.36 ± 0.15	—
Boned pickled meat B	Pigeon	24.13 ± 0.16	25.93 ± 0.11	40.00	40.00	24.52 ± 0.14	—
Boned pickled meat C	Pigeon	20.29 ± 0.08	22.60 ± 0.18	40.00	40.00	23.59 ± 0.07	—
Boned pickled meat D	Pigeon	21.02 ± 0.13	22.84 ± 0.19	40.00	40.00	22.60 ± 0.29	—
Boned pickled meat E	Pigeon	23.95 ± 0.22	25.92 ± 0.19	40.00	40.00	23.52 ± 0.20	—
Pickled thighs A	Pigeon	30.48 ± 0.19	33.23 ± 0.11	40.00	40.00	28.65 ± 0.15	—
Stewed meat A	Common pigeon	25.20 ± 0.11	28.21 ± 0.26	40.00	40.00	22.54 ± 0.18	—
Stewed meat B	Pigeon	19.86 ± 0.12	23.69 ± 0.13	40.00	40.00	20.87 ± 0.13	—
Stewed meat C	Pigeon	22.10 ± 0.18	24.15 ± 0.15	40.00	40.00	23.14 ± 0.16	—
Stewed meat D	Pigeon	22.31 ± 0.21	23.99 ± 0.26	40.00	40.00	23.51 ± 0.13	—
Stewed meat E	Pigeon	19.25 ± 0.13	20.30 ± 0.08	40.00	40.00	20.09 ± 0.15	—
Stewed meat F	Pigeon	21.14 ± 0.16	22.14 ± 0.09	40.00	40.00	21.50 ± 0.24	—
Stewed meat G	Pigeon	20.89 ± 0.22	22.96 ± 0.14	40.00	40.00	22.99 ± 0.26	—
Stewed meat H	Pigeon	20.68 ± 0.15	22.27 ± 0.14	40.00	40.00	22.86 ± 0.15	—
Stewed meat I	Pigeon	22.11 ± 0.11	24.92 ± 0.23	40.00	40.00	22.82 ± 0.22	—
Stewed meat J	Pigeon	20.99 ± 0.08	23.83 ± 0.17	40.00	40.00	22.80 ± 0.25	—
Stewed meat K	Pigeon	24.70 ± 0.21	24.70 ± 0.19	40.00	40.00	22.09 ± 0.19	—
Pâté A	Pigeon	28.51 ± 0.16	40.00	25.08 ± 0.17	40.00	24.30 ± 0.19	C, D, B, P
Pâté B	Pigeon	27.65 ± 0.17	40.00	25.29 ± 0.17	40.00	24.53 ± 0.20	C, D, B, P
Pâté C	Common pigeon	20.91 ± 0.17	23.60 ± 0.10	40.00	40.00	33.16 ± 0.10	B
Pâté D	Common pigeon	33.37 ± 0.22	35.93 ± 0.14	40.00	40.00	33.51 ± 0.17	B
Pâté E	Pigeon	33.34 ± 0.20	35.40 ± 0.13	40.00	40.00	32.69 ± 0.17	B, D
Pâté F	Pigeon	34.80 ± 0.19	35.97 ± 0.16	40.00	40.00	33.11 ± 0.13	B, D
Pâté G	Pigeon	34.61 ± 0.11	35.24 ± 0.12	40.00	40.00	33.09 ± 0.12	B, D
Pâté H	Pigeon	33.93 ± 0.15	34.96 ± 0.09	40.00	40.00	33.12 ± 0.07	B, D
Pâté I	Pigeon	32.91 ± 0.19	34.71 ± 0.14	40.00	40.00	32.35 ± 0.24	B, D
Pâté J	Pigeon	34.52 ± 0.19	35.97 ± 0.16	40.00	40.00	33.10 ± 0.24	B, D
Pâté K	Pigeon	34.29 ± 0.27	36.01 ± 0.21	40.00	40.00	33.66 ± 0.11	B, D
Pâté L	Pigeon	33.69 ± 0.15	35.73 ± 0.18	40.00	40.00	33.16 ± 0.26	B, D
Mousse A	Pigeon	28.67 ± 0.10	30.71 ± 0.07	40.00	40.00	28.30 ± 0.30	B
Mousse B	Pigeon	28.72 ± 0.06	31.15 ± 0.17	40.00	40.00	27.81 ± 0.21	B
Mousse C	Pigeon	30.11 ± 0.16	32.52 ± 0.11	40.00	40.00	30.60 ± 0.19	B
Mousse D	Pigeon	29.98 ± 0.19	31.34 ± 0.11	40.00	40.00	29.53 ± 0.18	B



Table 2 (continued)

Type of product	Pigeon species stated in the label	Pigeon specific PCR system	Common pigeon specific PCR system	Woodpigeon specific PCR system	Stock pigeon specific PCR system	Positive control PCR system	Other species detected according to the label description
Mousse E	Pigeon	30.04 ± 0.10	31.29 ± 0.14	40.00	40.00	29.23 ± 0.22	B
Mousse F	Pigeon	29.46 ± 0.23	31.25 ± 0.09	40.00	40.00	29.57 ± 0.16	B
Mousse G	Pigeon	30.35 ± 0.14	32.65 ± 0.18	40.00	40.00	30.57 ± 0.32	B

Average  $C_p$  value ± SD shown from duplicate reactions  $C_p$  of 40.00 indicates no amplification after 40 cycles.

C=Chicken; D = Duck; B=Bovine; P=Pig.

<sup>a</sup> Not determined for being 100% pigeon meat.

to the same day. This could be ascribed to the fact that different master mix vials were used in the assays performed on different days and it could be also attributed to minimal volumetric variations caused by pipetting errors in any of the steps of the real-time PCR experiment (DNA aliquot preparation, mix of reagents, dispensation of the master mix into the PCR capillaries, etc.). Thus, for the quantification of pigeon DNA, a standard curve should be determined on each day of analysis.

### 3.6. Application of the assay to commercial meat products

The method was also tested with regard to its suitability for the detection of pigeon DNA in commercial meat products. For that purpose DNA samples extracted from several meat products labelled as pigeon were analyzed. As can be seen in Table 2, pigeon-specific primers (12SPigeon-Fw/12SPigeon-Rev) successfully detected the presence of pigeon in all the commercial meat products analyzed. Concerning the specific identification of common pigeon, woodpigeon, and stock pigeon species, all the meat products labelled as common pigeon were amplified with common pigeon specific primers. Nevertheless, neither of the meat products labelled as stock pigeon produced positive results with the stock pigeon specific real-time PCR system. However, these samples were amplified with common pigeon specific primers, which suggest a possible fraud in the labelling of these products derived from the substitution of stock pigeon meat for meat of common pigeon. On the other hand, all the meat products labelled as pigeon were amplified with common pigeon specific primers excepting two pâté samples in which woodpigeon species was detected. These results indicate that common pigeon is the pigeon species most frequently used for the preparation of pigeon meat products.

In addition, commercial meat samples containing more than one species in their composition were also tested for the presence of other animal species stated in the label such as chicken, duck, cattle, and pig. For this purpose, conventional PCR assays using species-specific primers for the mentioned species were carried out. In all the samples tested, the results obtained were in accordance with the species composition stated in the labels (Table 2).

Regarding the quantification of pigeon in complex commercial meat products, it should be noted that although this is a technique with quantitative potential, the use of the standard equations developed in this work does not turn out to be suitable for the quantification of pigeon content in the commercial products analyzed. This is ascribed to the fact that, as previously explained, the present real-time PCR method only allows quantification of pigeon if the samples analyzed have the same matrix composition and have received the same heat-treatment than the reference samples. Thus, for true quantification, it would be necessary to prepare appropriate calibration standards similar in composition and heat-treatment than the commercial samples. However, taking into account the great variety of ingredients used in the preparation of commercial meat products (meat, liver, fat, oil, milk, butter, vegetables, etc.) as well as the diversity of heat treatments applied by the meat industry, the preparation of calibration standards for

each type of product is not feasible. Therefore, the use of the present real-time PCR technique for the analysis of commercial meat products is limited to qualitative detection of the target species. Nevertheless, the results obtained in this work demonstrate the usefulness of the present real-time technique for verifying the labelling of pigeon meat products even when it is only applied for detection purposes.

The vast majority of PCR applications for meat species identification published to date, are focused in domestic species such as cattle, sheep, goat, swine, turkey, chicken, duck, or goose (Colgan et al., 2001; Di Pinto, Forte, Conversano, & Tantiello, 2005; Köppel et al., 2009). However, considerably fewer studies have been published so far with regard to pigeon meat products authentication employing PCR techniques. Among them, PCR-RFLP based methods (Rojas et al., 2008; 2009b) may result unsuitable for species identification in the analysis of thermally processed meats harbouring highly fragmented DNA, since relatively large amplicons are commonly required to carry out enzymatic restriction of DNAs. In addition, the applicability of PCR-RFLP methodology is limited in the analysis of complex meat products (pâtés, minced meats, etc.) including two or more species in their composition, because results obtained after digestion of the PCR products might show a combination of miscellaneous restriction patterns representing all the possible species included in the adulterated sample. Species-specific PCR (Haunshi et al., 2009; Rojas et al., 2010a), or real-time PCR assays (Rojas et al., 2010b) have also been previously reported for the identification of pigeon meat. These techniques are suitable for the analysis of heat-treated pigeon meat products and admixed meats. However, neither of these methods allows the specific identification of common pigeon, woodpigeon, and stock pigeon species.

The main potential advantage of real-time PCR technology is the possibility of performing detection measurements at an early stage in the PCR process which is more precise than the end point analysis typically associated with gel based measurement. Real-time PCR assays are rapid, LightCycler tests can be completed in 30–40 min, and potential contamination of the PCR mixture with target DNA is greatly reduced because the reaction tubes remain closed throughout the assay (Sawyer, Wood, Shanahan, Gout, & McDowell, 2003). However, it should be considered that the application of TaqMan<sup>®</sup> assays require the availability of primers and probes that must be selected according to very rigid conditions, which cannot always be easily met. In addition, it should be also taken into account the relatively high cost of TaqMan<sup>®</sup> based approaches. The cost per reaction can be reduced using SYBR<sup>®</sup> Green as fluorescent dye instead of oligonucleotide probes. However, the non-specific nature of SYBR<sup>®</sup> Green dye gives rise to fluorescence signal in the presence of any double stranded DNA including undesired primer-dimer products which may lead to erroneous readouts because false positives may appear due to unspecific amplification. Besides, primer-dimer formation interferes with the formation of specific products because of competition of the two reactions for reagents. By contrast, when TaqMan<sup>®</sup> probes are used, mispriming and primer dimers do not contribute to the fluorescence signal which enhances dramatically the

specificity of the assay and decreases the amount of time required for assay development and optimization (Houghton & Cockerill, 2006; Kubista et al., 2006).

In conclusion, the results obtained in the present work demonstrate that the TaqMan® real-time PCR assay proposed represents a powerful alternative for the detection of pigeon species and the specific identification of common pigeon, woodpigeon, and stock pigeon meat products. Consequently, this methodology could be used in inspection programs to enforce accurate labelling of pigeon meat products, thereby protecting both producers and consumers against pigeon meat adulteration and misrepresentation.

### Acknowledgements

This study was supported by Grant No. AGL 2007-60077 from the Ministerio de Educación y Ciencia of Spain and the *Programa de Vigilancia Sanitaria 2009/AGR/1489* from the Comunidad de Madrid (Spain).

We are indebted to D. José Peña (Centro de Recuperación de Fauna y Educación Ambiental de Navas del Rey, Madrid) for kindly supplying stock pigeon samples.

### References

- Camacho, M. A., Torres, A. I., Gil-Alegre, M. E., Obregón, M. M., & Ruz, V. (1993). Validation protocol of analytical methods for finished pharmaceutical products. *STP Pharma Pratiques*, 3, 197–202.
- Che Man, Y. B., Aida, A. A., Raha, A. R., & Son, R. (2007). Identification of pork derivatives in food products by species-specific polymerase chain reaction (PCR) for halal verification. *Food Control*, 18, 885–889.
- Colgan, S., O'Brien, L., Maher, M., Shilton, N., McDonnell, K., & Ward, S. (2001). Development of a DNA-based assay for species identification in meat and bone meal. *Food Research International*, 34, 409–414.
- Di Pinto, A., Forte, V. T., Conversano, M. C., & Tantillo, G. M. (2005). Duplex polymerase chain reaction for detection of pork meat in horse meat fresh sausages from Italian retail sources. *Food Control*, 16, 391–394.
- European Commission. (2001). Directive 2001/101/EC of 26 November 2001 amending directive 2000/13/EC of the European parliament and of the council on the approximation of 20 March 2000 on the approximation of the laws of the member states relating to the labelling, presentation and advertising of foodstuffs. *Official Journal of the European Communities L*, 310, 19–21.
- Fajardo, V., González, I., López-Calleja, I., Martín, I., Hernández, P. E., García, T., et al. (2006). PCR-RFLP authentication of meats from red deer (*Cervus elaphus*), fallow deer (*Dama dama*), roe deer (*Capreolus capreolus*), cattle (*Bos taurus*), sheep (*Ovis aries*), and goat (*Capra hircus*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 1144–1150.
- Girish, P. S., Anjaneyulu, A. S. R., Viswas, K. N., Anand, M., Rajkumar, N., Shivakumar, B. M., et al. (2004). Sequence analysis of mitochondrial 12S rRNA gene can identify meat species. *Meat Science*, 66, 551–556.
- Haunshi, S., Basumatary, R., Girish, P. S., Doley, S., Bardoloi, R. K., & Kumar, A. (2009). Identification of chicken, duck, pigeon and pig meat by species-specific markers of mitochondrial origin. *Meat Science*, 83, 454–459.
- Hird, H., Chisholm, J., Sánchez, A., Hernández, M., Goodier, R., & Schneede, K. (2006). Effect of heat and pressure processing on DNA fragmentation and implications for the detection of meat using a real-time polymerase chain reaction. *Food Additives and Contaminants*, 23, 645–650.
- Houghton, S. G., & Cockerill, F. R. (2006). Real-time PCR: overview and applications. *Surgery*, 139, 1–5.
- ICH Harmonised Tripartite Guideline. (2005). *Validation of analytical procedures: Text and methodology*. Q2, (R1).
- Kesmen, Z., Gulluce, A., Sahin, F., & Yetim, H. (2009). Identification of meat species by TaqMan-based real-time PCR assay. *Meat Science*, 82, 444–449.
- Köppel, R., Zimmerli, F., & Breitenmoser, A. (2009). Heptaplex real-time PCR for the identification and quantification of DNA from beef, pork, chicken, turkey, horse meat, sheep (mutton) and goat. *European Food Research Technology*, 230, 125–133.
- Kubista, M., Andrade, J. M., Bengtsson, M., Forootan, A., Jonäs, J., Lind, K., et al. (2006). The real-time polymerase chain reaction. *Molecular Aspects of Medicine*, 27, 95–129.
- Martín, I., García, T., Fajardo, V., López-Calleja, I., Hernández, P. E., González, I., et al. (2007). Species-specific PCR for the identification of ruminant species in feedstuffs. *Meat Science*, 75, 120–127.
- Martín, I., García, T., Fajardo, V., López-Calleja, I., Rojas, M., Hernández, P. E., et al. (2007). Mitochondrial markers for the detection of four duck species and the specific identification of Muscovy duck in meat mixtures using the polymerase chain reaction. *Meat Science*, 76, 721–729.
- Martín, I., García, T., Fajardo, V., López-Calleja, I., Rojas, M., Pavón, M. A., et al. (2007). Detection of chicken, turkey, duck, and goose tissues in feedstuffs, using species-specific polymerase chain reaction. *Journal of Animal Science*, 85, 452–458.
- Martín, I., García, T., Fajardo, V., Rojas, M., Pegels, N., Hernández, P. E., et al. (2008). SYBR-Green real-time PCR approach for the detection and quantification of pig DNA in feedstuffs. *Meat Science*, 82, 252–259.
- Peter, C., Brunen-Nieweler, C., Cammann, K., & Borchers, T. (2004). Differentiation of animal species in food by oligonucleotide microarray hybridization. *European Food Research Technology*, 219, 286–293.
- Pomianowski, J. F., Mikulski, D., Pudyszak, K., Cooper, R. G., Angowski, M., Jozwik, A., et al. (2009). Chemical composition, cholesterol content, and fatty acid profile of pigeon meat as influenced by meat-type breeds. *Poultry Science*, 88, 1306–1309.
- Prado, M., Calo-Mata, P., Villa, T. G., Cepeda, A., & Barros-Velázquez, J. (2007). Co-amplification and sequencing of a cytochrome b fragment affecting the identification of cattle in PCR-RFLP food authentication studies. *Food Chemistry*, 105, 436–442.
- Rojas, M., González, I., Fajardo, V., Martín, I., Hernández, P. E., García, T., et al. (2008). Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism authentication of raw meats from game birds. *Journal of AOAC International*, 91, 1416–1422.
- Rojas, M., González, I., Fajardo, V., Martín, I., Hernández, P. E., García, T., et al. (2009a). Authentication of meats from quail (*Coturnix coturnix*), pheasant (*Phasianus colchicus*), partridge (*Alectoris* spp.), and guinea fowl (*Numida meleagris*) using polymerase chain reaction targeting specific sequences from the mitochondrial 12S rRNA gene. *Food Control*, 20, 896–902.
- Rojas, M., González, I., Fajardo, V., Martín, I., Hernández, P. E., García, T., et al. (2009b). Identification of raw and heat-processed meats from game bird species by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism of the mitochondrial D-loop region. *Poultry Science*, 88, 669–679.
- Rojas, M., González, I., Pavón, M. A., Pegels, N., Hernández, P. E., García, T., et al. (2010a). Polymerase chain reaction assay for verifying the labeling of meat and commercial meat products from game birds targeting specific sequences from the mitochondrial d-loop region. *Poultry Science*, 89, 1021–1032.
- Rojas, M., González, I., Pavón, M. A., Pegels, N., Hernández, P. E., García, T., et al. (2010b). A novel TaqMan® real-time polymerase chain reaction assay for verifying the authenticity of meat and commercial meat products from game birds. *Food Additives and Contaminants*, 27, 749–763.
- Sawyer, J., Wood, C., Shanahan, D., Gout, S., & McDowell, D. (2003). Real-time PCR for quantitative meat species testing. *Food Control*, 14, 579–583.
- Soares, S., Amaral, J. S., Mafrá, I., & Oliveira, M. B. (2010). Quantitative detection of poultry meat adulteration with pork by a duplex PCR assay. *Meat Science*, 85, 531–536.
- Stamoulis, O., Stamatis, C., Sarafidou, T., & Mamuris, Z. (2010). Development and application of molecular markers for poultry meat identification in food chain. *Food Control*, 21, 1061–1065.
- Woolfe, M., & Primrose, S. (2004). Food forensics: using DNA technology to combat misdescription and fraud. *Trends in Biotechnology*, 22, 222–226.
- Zhang, C., Fowler, M. R., Scott, N. W., Lawson, G., & Slater, A. (2007). A TaqMan® real-time PCR system for the identification and quantification of bovine DNA in meats, milks and cheeses. *Food Control*, 18, 1149–1158.

# *CAPÍTULO IV*

## *Resultados y Discusión*

---







#### IV.1. IDENTIFICACIÓN DE CARNES Y PRODUCTOS CÁRNICOS PROCEDENTES DE ESPECIES DE AVES DE CAZA Y DE LA AVICULTURA ALTERNATIVA POR TÉCNICAS GENÉTICAS

La determinación del origen de las materias primas e ingredientes de los alimentos es un requisito fundamental para cumplir con las exigencias legales de etiquetado y trazabilidad. Concretamente, las carnes y productos cárnicos procedentes de especies de aves de caza y de la avicultura alternativa, son a menudo objeto de un etiquetado fraudulento debido a las diferencias de precio que se registran entre las distintas especies que se comercializan. Este tipo de fraudes se suelen producir con mayor frecuencia en productos fileteados, deshuesados, picados, escabechados, etc., así como en diferentes preparaciones culinarias en las que no es posible reconocer morfológicamente las especies de procedencia. Por ello, es necesario el desarrollo de métodos de análisis eficaces y rápidos que garanticen la autenticidad de los productos comercializados (Brodmann y col., 2001; Mafra y col., 2008). Asimismo, la identificación de especies es importante para verificar el cumplimiento de las prohibiciones y vedas que establece la ley de caza. La caza furtiva, junto con el comercio de especies protegidas, ha contribuido a poner en peligro la supervivencia de un elevado número de especies de aves (Teletchea y col., 2005).

La metodología convencional utilizada para la identificación de especies ha estado predominantemente basada en el análisis de

proteínas. Sin embargo, actualmente las técnicas basadas en el análisis del ADN, constituyen una atractiva estrategia para la identificación de especies, ya que son rápidas, pueden diferenciar especies estrechamente relacionadas y permiten el análisis de muestras sometidas a tratamientos térmicos intensos (Tingey, 2003; Teletchea y col., 2005).

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) ha sido, con diferencia, la herramienta que ha permitido una mayor expansión de las técnicas genéticas. Hasta su descubrimiento en la década de los ochenta, si se quería obtener un determinado fragmento de ADN en cantidad suficiente para su análisis, el único camino viable era seguir laboriosos y lentos procedimientos de clonación. La técnica de PCR, sin embargo, permite obtener millones de copias de una secuencia específica de ADN mediante una simple reacción enzimática. Por ello, esta técnica ha causado un profundo impacto en todas las áreas de investigación biológica y biomédica y se emplea en multitud de aplicaciones: diagnóstico de enfermedades genéticas y hereditarias, detección de infecciones microbianas, estudios de evolución molecular, medicina forense, identificación de especies y detección de microorganismos patógenos y alterantes de los alimentos (Klingspor y Jalal, 2006; Sevilla y col., 2007; Lu y col., 2008; Rantsiou y col., 2008).

Asimismo, las técnicas de PCR se han empleado con éxito en la identificación de diferentes especies animales en los alimentos, bien de forma directa (Herman,

2001; Ha y col., 2006; Tobe y Linacre, 2008), o complementada con otras técnicas como la secuenciación (Girish y col., 2004; Maede, 2006; Prado y col., 2007; La Neve y col., 2008), el análisis del polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción de regiones amplificadas por PCR (PCR-RFLP) (Shin y col., 2006; Zhang y col., 2007; Chen y col., 2010) o el análisis del polimorfismo del ADN amplificado con cebadores arbitrarios (RAPD) (Sáez y col., 2004; Arslan y col., 2005; Mane y col., 2008), entre otras.

Las técnicas de PCR se han utilizado para la determinación del origen animal en un amplio número de alimentos como la leche y productos lácteos (Abdel-Rahman y Ahmed, 2007; López-Calleja y col., 2007; Dalmasso y col., 2010; De y col., 2011), pescado y productos de la pesca (Lin y Hwang, 2007; Hubalkova y col., 2008; Pascoal y col., 2008; Sánchez y col., 2009) y carne y productos cárnicos (Di Pinto y col., 2005; Park y col., 2007; Bai y col., 2009; Wang y col., 2010). En el caso de la carne y productos cárnicos, son numerosos los estudios dirigidos a la identificación de especies domésticas de consumo habitual como la vaca, oveja, cerdo, pollo, pavo, pato y oca (Rodríguez y col., 2003a; Jonker y col., 2008; Kesmen y col., 2009; Köppel y col., 2009; Soares y col., 2010) o especies de caza mayor como el ciervo, corzo, gamo, rebeco y jabalí (Brodmann y col., 2001; Rajapaksha y col., 2002; La Neve y col., 2008; Fajardo y col., 2008, 2009). Sin embargo, cabe señalar que las publicaciones existentes hasta el momento en el área de la identificación genética de especies de aves de caza y de la avicultura alternativa son,

comparativamente, mucho más escasas (Girish y col., 2007; Chisholm y col., 2008a; Stamoulis y col., 2010). Por ello, este trabajo de investigación se ha centrado en la puesta a punto de diversas técnicas genéticas (PCR-RFLP, PCR con cebadores especie-específicos y PCR en tiempo real) para la identificación de carnes y productos cárnicos procedentes de especies de aves de caza y de la avicultura alternativa, entre las que se incluyen la codorniz (*Coturnix coturnix*), perdiz roja (*Alectoris rufa*), perdiz chukar (*Alectoris chukar*), perdiz moruna (*Alectoris barbara*), perdiz pardilla (*Perdix perdix*), faisán (*Phasianus colchicus*), pintada (*Numida meleagris*), paloma bravía (*Columba livia*), paloma torcaz (*Columba palumbus*), paloma zurita (*Columba oenas*), becada (*Scolopax rusticola*), zorzal común (*Turdus philomelos*), urogallo (*Tetrao urogallus*) y avestruz (*Struthio camelus*). Asimismo, se ha abordado la diferenciación de estas carnes de otras procedentes de especies domésticas como el pollo, pavo, pato y oca. A continuación, se describen los resultados más relevantes alcanzados en cada uno de los objetivos planteados.

#### IV.1.1. TÉCNICA DE PCR-RFLP

El primer objetivo de este trabajo de investigación consistió en el desarrollo de técnicas de PCR-RFLP (análisis del polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción de regiones amplificadas por PCR) para la identificación de carnes procedentes de codorniz, faisán, perdiz roja, perdiz chukar, pintada, urogallo, becada, paloma torcaz, paloma bravía, zorzal común y avestruz, así como para su diferenciación

de otras especies comerciales como el pollo, pavo, pato de berbería y oca.

La identificación de especies animales mediante técnicas genéticas exige una cuidadosa selección de los marcadores genéticos a utilizar. El gen seleccionado debe poseer regiones conservadas que permitan amplificar el mismo fragmento de ADN en todas las especies objeto de estudio, pero a la vez las regiones de ADN seleccionadas deben poseer un grado de mutación suficiente para que especies estrechamente relacionadas tengan secuencias de nucleótidos diferentes, sin que exista polimorfismo intraespecífico.

Muchos de los trabajos sobre identificación genética de especies animales se basan en el análisis del genoma mitocondrial. Se trata de un ADN haploide y no recombinante, que no posee intrones y apenas tiene espacios intergénicos. Además, es mucho más pequeño que el ADN nuclear (16 500 + 500 pb) y cada célula posee miles de copias (Fumière y col., 2009). Esta última particularidad es importante cuando el material genético de partida es muy escaso o se encuentra degradado. Asimismo, el ADN mitocondrial tiene una tasa de evolución de cinco a diez veces superior al ADN nuclear, cualidad que le confiere un apropiado nivel de variabilidad genética para la diferenciación de especies (Meyer, 1993). Los marcadores mitocondriales más utilizados para la diferenciación de especies animales en los alimentos han sido el gen que codifica para el citocromo b (Verkaar y col., 2002; Aida y col., 2005; Di Pinto y col., 2005; Yan y col., 2005; Maede,

2006; Tanabe y col., 2007; Abdel-Rahman y col., 2009; Bai y col., 2009; Nebola y col., 2010; Stamoulis y col., 2010), el gen 12S ARNr (Sun y Lin, 2003; Girish y col., 2005; Fajardo y col., 2006; Che Man y col., 2007; Natonek-Wisniewska y Slota, 2009; Chen y col., 2010; Wang y col., 2010), el gen 16S ARNr (Abdulmawjood y Bülte, 2001; Fujimura y col., 2008; Ghovvati y col., 2009; Pascoal y col., 2011), la región D-loop (Montiel-Sosa y col., 2000; Quinteiro y col., 2001; Fajardo y col. 2007c; Haunshi y col., 2009; Sánchez y col., 2009), el gen citocromo oxidasa I (Feligini y col., 2007; Espiñeira y col., 2008; Xia y col., 2009; Herrero y col., 2010; Rasmussen y col., 2010), las subunidades de la NADH deshidrogenasa (Infante y col., 2006; Kesmen y col., 2007; Rastogi y col., 2007) y las subunidades de la ATPasa (Bertoja y col., 2009; Kesmen y col., 2009; Shinoda y col., 2011).

No obstante, a pesar de que la mayoría de los estudios de identificación de especies han empleado ADN mitocondrial, otros emplean genes nucleares, como el gen que codifica la  $\alpha$ -actina (Rodríguez y col., 2003b; Rastogi y col., 2007), el gen 5S ARNr (Infante y Manchado, 2006; Asensio, 2008; Pinhal y col., 2008; Bektas y Belduz, 2009; Catanese y col., 2010), el gen que codifica el receptor 1 de la melanocortina (MC1R) (Maudet y Taberlet, 2002; Evans y col., 2007; Sasazaki y col., 2007; Fajardo y col., 2008a) o el gen supresor de tumores p53 (Carrera y col., 2000; Bellis y col., 2003).

Para llevar a cabo las técnicas de PCR-RFLP planteadas en este trabajo, se

consideró conveniente seleccionar genes con regiones conservadas entre las especies objeto de estudio, para poder amplificar un fragmento conservado en todas ellas. Asimismo, los genes seleccionados debían poseer un nivel adecuado de polimorfismos interespecíficos que permitiesen la diferenciación de especies mediante el empleo de enzimas de restricción. Tras la búsqueda bibliográfica y el posterior estudio de secuencias disponibles en la base de datos *Genbank/EMBL* del *NCBI (National Center for Biotechnology Information)*, los marcadores elegidos para el desarrollo de técnicas de PCR-RFLP para la identificación de especies de aves de caza y de la avicultura alternativa, fueron el gen mitocondrial que codifica la subunidad 12S del ARN ribosómico (gen 12S ARNr) y la región polimórfica D-loop incluida en la región control del ADN mitocondrial. Estos genes presentan una longitud y una tasa de mutación adecuadas para la identificación de especies estrechamente relacionadas. La zona D-loop, en particular, posee una elevada tasa de evolución debido a sustituciones, adiciones y deleciones de nucleótidos, siendo la principal responsable de las variaciones en longitud que presenta el genoma mitocondrial (Fajardo y col., 2007a). Aunque en la identificación de especies animales en los alimentos mediante PCR-RFLP, la mayoría de los trabajos publicados utilizan como marcador genético el gen mitocondrial citocromo b (Wolf y col., 1999; Partis y col., 2000; Abdulmawjood y Bülte, 2002; Verkaar y col., 2002; Pfeiffer y col., 2004; Maede, 2006; Pascoal y col., 2008; Murugaiah y col.,

2009), el gen 12S ARNr y la región D-loop también han sido ampliamente utilizados con este fin (Sun y Lin, 2003; Fajardo y col., 2006; Girish y col., 2007; Malisa y col., 2007; Park y col., 2007; Saini y col., 2007; Wang y col., 2010).

Una vez elegidos los genes 12S ARNr y D-loop como marcadores genéticos, se procedió al diseño de parejas de cebadores que permitieran la amplificación de fragmentos conservados de cada uno de los genes seleccionados en codorniz, faisán, perdiz roja, perdiz chukar, pintada, bécada, paloma torcaz, paloma bravía, zorzal común, urogallo, avestruz, pollo, pavo, pato de berbería y oca. En el caso de la técnica desarrollada en el gen 12S ARNr, se seleccionaron los cebadores 12S-Fw y 12S-Rev diseñados por Fajardo y col. (2006) a partir de secuencias del gen 12S ARNr de varias especies de aves y mamíferos. El empleo de esta pareja de cebadores en una técnica de PCR permitió la amplificación de un fragmento conservado de aproximadamente 720 pb a partir del ADN extraído de tejido muscular de las especies objeto de estudio. Con relación al ensayo basado en la región mitocondrial D-loop, el estudio informático de las secuencias disponibles en la base de datos *Genbank/EMBL* de este marcador para diferentes especies animales, permitió el diseño de los cebadores DloopShort-Fw y DloopShort-Rev, que amplificaron un fragmento conservado de aproximadamente 310 pb en todas las especies analizadas, a excepción del avestruz, en la que no se obtuvo amplificación con estos cebadores.

Tras comprobar la idoneidad de la amplificación de los fragmentos conservados de 720 y 310 pb con las parejas de cebadores 12S-Fw/12S-Rev y DloopShort-Fw/DloopShort-Rev, respectivamente, se purificaron y secuenciaron los amplicones obtenidos a partir del ADN extraído de al menos dos ejemplares de cada especie. Las secuencias obtenidas se registraron en la base de datos *Genbank/EMBL*. Los números de acceso de las secuencias del gen 12S ARNr son los siguientes: AM902516, (codorniz); AM902515 (faisán); AM902517 (perdiz roja); AM944504 (perdiz chukar); AM902518 (pintada); AM902520 (urogallo); AM902519 (becada); AM902521 (paloma torcaz); FN675577 (paloma bravía); AM902522 (zorzal común), FN675552 (avestruz) y AM902523 (pato de berbería). Conviene señalar que en el pollo, pavo y oca, no se procedió a la purificación y secuenciación del fragmento de 720 pb del gen 12S ARNr debido al elevado número de secuencias de este gen disponibles en la base de datos *Genbank/EMBL* para las tres especies. Por otra parte, las secuencias del gen D-loop aparecen registradas en la base de datos con los siguientes números de acceso: FM164774 (codorniz); FM164775 (faisán); FM164776 (perdiz roja); FM164777 (perdiz chukar); FM164778 (pintada); FM164779 (urogallo); FM164780 (becada); FM164781 (paloma torcaz); FN376876 (paloma bravía); FN376877 (zorzal común); FM164782 (pollo); FM164783 (pavo); FM164784 (pato de berbería) y FM164785 (oca). El registro de estas secuencias en la base de datos *Genbank/EMBL* adquiere gran relevancia, puesto que para muchas de las

especies objeto de estudio no se disponía de secuencias de los genes mitocondriales 12S ARNr y D-loop registradas previamente, o bien estas eran escasas o de menor tamaño.

La información contenida en las secuencias permitió elaborar los mapas de restricción de las especies objeto de estudio. En el caso de la técnica de PCR-RFLP basada en el gen 12S ARNr, se seleccionaron las enzimas *AluI* y *Bfal* para llevar a cabo la diferenciación de las especies diana. En la *Figura 1* (págs. 80-81) se muestra el alineamiento de las secuencias del gen 12S ARNr de codorniz, faisán, perdiz roja, pintada, urogallo, becada, paloma torcaz, zorzal común, pollo, pavo, pato de berbería y oca, y aparece marcada la posición de las dianas de restricción de las dos endonucleasas seleccionadas. La *Figura 2* (pág. 84) incluye los perfiles electroforéticos obtenidos tras la digestión de los productos de PCR del gen 12S ARNr de las especies mencionadas con las enzimas *AluI* y *Bfal*. La digestión de los productos de PCR con las endonucleasas seleccionadas originó patrones de bandas especie-específicos. La enzima *AluI* generó perfiles característicos en codorniz, perdiz roja, pintada, becada, paloma torcaz, pollo, pavo y pato de berbería. No obstante, el perfil electroforético obtenido en las muestras de faisán y urogallo fue prácticamente similar. Asimismo, los patrones de bandas obtenidos en zorzal común y oca podrían confundirse en las imágenes electroforéticas, debido a la proximidad en la longitud de sus fragmentos de restricción. Por este motivo se seleccionó otra enzima, la *Bfal*, que permitió la diferenciación inequívoca de estas cuatro especies.

Por otra parte, en este trabajo también se llevó a cabo el análisis por PCR-RFLP de perdiz chukar, paloma bravía y avestruz. La digestión de los productos de PCR del gen 12S ARNr de perdiz chukar con las enzimas *AluI* y *BfaI* generó perfiles electroforéticos similares a los obtenidos para la perdiz roja. Con relación a la paloma bravía y el avestruz, los perfiles electroforéticos obtenidos fueron distintos a los generados en el resto de especies analizadas. Las muestras de paloma bravía originaron fragmentos visibles de 302, 122, 73, 72 y 68 pb con la enzima *AluI*, y de 350, 193 y 167 pb con la enzima *BfaI*. En el caso del avestruz, la digestión de los productos de PCR del gen 12S ARNr con las enzimas *AluI* y *BfaI* dio lugar a fragmentos visibles de 452, 107 y 78 pb, y de 328, 276 y 110 pb, respectivamente (resultados no mostrados).

Con respecto a la técnica de PCR-RFLP basada en el gen D-loop, tras el estudio detallado de los mapas de restricción obtenidos, se seleccionaron las endonucleasas *HinfI*, *MboI* y *Hpy188III* para llevar a cabo la diferenciación de las especies objeto de estudio. En la *Figura 3* (pág. 93) aparece el alineamiento de las secuencias obtenidas del gen D-loop de codorniz, faisán, perdiz roja, perdiz chukar, pintada, urogallo, becada, paloma torcaz, pollo, pavo, pato de berbería y oca, así como la localización de los lugares de restricción de las tres enzimas elegidas. El empleo combinado de las endonucleasas *HinfI*, *MboI* y *Hpy188III* en reacciones de restricción independientes, hizo posible la identificación inequívoca de todas las especies analizadas. Como puede observarse en la *Figura 4* (pág. 95), la enzima

*HinfI* permitió la diferenciación de codorniz y pintada del resto de especies. Sin embargo, los perfiles electroforéticos obtenidos en las muestras de faisán, perdiz roja, perdiz chukar, pintada, pollo, oca, urogallo y becada, fueron similares. Asimismo, la ausencia de dianas de restricción para esta enzima en pavo, pato de berbería y paloma torcaz, generó un fragmento no digerido de aproximadamente el mismo tamaño en las tres especies, impidiendo de este modo la diferenciación de las mismas. No obstante, los perfiles electroforéticos generados con la enzima *MboI* permitieron la diferenciación de paloma torcaz, becada, pollo, pavo, pato de berbería y oca del resto de especies. Finalmente, para la diferenciación de perdiz roja, perdiz chukar, faisán y urogallo fue necesario el empleo de la enzima *Hpy188III*. Conviene especificar que la técnica de PCR-RFLP desarrollada se empleó también para llevar a cabo la diferenciación de zorzal común y paloma bravía. No obstante, los productos de PCR del gen D-loop amplificados a partir del ADN de zorzal común presentaron una intensidad escasa, lo que dificultó la visualización de las bandas originadas tras la restricción enzimática de los mismos con las enzimas *HinfI*, *MboI* y *Hpy188III*. Aun así, a pesar de la escasa intensidad de las bandas, pudo comprobarse que los perfiles electroforéticos eran distintos a los generados en el resto de especies, al obtenerse bandas de 306 pb con la enzima *HinfI*, 161, 96 y 49 pb con la enzima *MboI*, y 119, 110 y 77 pb con la enzima *Hpy188III*. Con relación a la paloma bravía, la digestión de los productos de PCR del gen D-loop con las tres enzimas seleccionadas generó



perfiles electroforéticos similares a los obtenidos para la paloma torcaz (resultados no mostrados).

En ambas técnicas, los fragmentos de ADN obtenidos en cada especie tras el análisis electroforético de los productos de la digestión con las endonucleasas seleccionadas, coincidieron con los correspondientes mapas de restricción (*Tabla 1*, pág. 83; *Tabla 2*, pág. 94). Se debe aclarar que aunque la resolución del gel de agarosa no permitió visualizar los fragmentos menores de 50 pb resultantes de las digestiones enzimáticas, el número y el tamaño de las bandas de ADN que se observaron en los geles fueron suficientes y adecuados para la identificación de cada una de las especies seleccionadas. Se analizaron quince individuos de cada especie y no se observaron variaciones intraespecíficas en los perfiles de restricción generados, confirmando la reproducibilidad de las técnicas de PCR-RFLP desarrolladas.

Un factor crucial a tener en cuenta para la identificación de especies mediante técnicas genéticas de PCR, es la fragmentación que puede sufrir el ADN de las muestras debido a las tecnologías de procesamiento aplicadas en la industria alimentaria. Aunque el ADN es una molécula bastante estable, los tratamientos térmicos intensos pueden producir su fragmentación limitando la eficacia de la reacción de amplificación. Cuanto mayor es la fragmentación del ADN de una muestra, menor es el número de copias intactas de un gen que se encuentran presentes y, por tanto, resulta más difícil su amplificación por PCR

(Herman, 2001; Girish y col., 2004). Por este motivo, cuando se analizan muestras sometidas a tratamientos térmicos intensos, es preferible seleccionar regiones de ADN de pequeño tamaño para poder aplicar con éxito las técnicas de PCR.

Con el fin de evaluar la influencia de los tratamientos de procesamiento empleados en la industria alimentaria en la aplicabilidad de las técnicas de PCR-RFLP desarrolladas, en este trabajo se analizaron muestras cárnicas sometidas a tratamientos térmicos experimentales de esterilización (121 °C durante 20 min), así como diversos productos comerciales que consistían en conservas de carne escabechada y estofada de codorniz, faisán, perdiz y pintada. Con relación a la técnica de PCR-RFLP basada en el gen D-loop, los cebadores D-loopShort-Fw y D-loopShort-Rev amplificaron el fragmento conservado de 310 pb en todas las muestras analizadas. A continuación, los productos de PCR amplificados se digirieron con las endonucleasas seleccionadas (*Hinfl*, *MbolI* y *Hpy188III*) y los fragmentos resultantes se analizaron por electroforesis en gel de agarosa. La técnica de PCR-RFLP basada en el gen D-loop permitió la identificación de las especies objeto de estudio en las muestras esterilizadas así como en los productos escabechados y estofados que contenían carne de una única especie diana. En el caso de los productos comerciales, los resultados obtenidos revelaron que el origen de las muestras de carne analizadas coincidía con la especie descrita en el etiquetado (*Figura 5*, pág. 96). Respecto a los productos de perdiz, cabe destacar que en aquellos etiquetados como “carne de

perdiz roja” la especie detectada fue perdiz roja, mientras que en los productos etiquetados como “carne de perdiz” la especie detectada fue perdiz chukar. Por el contrario, cuando se emplearon los cebadores 12S-Fw/12S-Rev, no se amplificó el fragmento de ADN conservado de 720 pb del gen 12S ARNr en ninguna de las muestras esterilizadas ni tampoco en los productos comerciales. Por tanto, la aplicabilidad de la técnica basada en el gen mitocondrial 12S ARNr queda limitada al análisis de carnes y productos cárnicos crudos, no resultando adecuada para el análisis de alimentos sometidos a tratamientos térmicos intensos u otros métodos de procesado donde el ADN se encuentre degradado. Estos resultados ponen de manifiesto la influencia del tamaño del fragmento diana en la eficacia de la reacción de PCR. Como se ha indicado anteriormente, el empleo de tratamientos térmicos intensos en las muestras analizadas limita la amplificación por PCR de fragmentos de elevado tamaño, como es el caso del fragmento de 720 pb del gen 12S ARNr. Sin embargo el menor tamaño del fragmento generado por los cebadores D-loopShort-Fw y D-loopShort-Rev (310 pb) permite la amplificación del mismo aunque las muestras hayan sido sometidas a tratamientos térmicos intensos.

A pesar de la extensa bibliografía existente sobre la aplicación de la técnica genética de PCR-RFLP para la detección e identificación de especies animales en carnes y productos cárnicos, hay que señalar que la práctica totalidad de los estudios realizados hasta el momento se han

centrado en especies domésticas o en especies de caza mayor (Wolf y col., 1999; Pascoal y col., 2004; Girish y col., 2005; Fajardo y col., 2006; Malisa y col., 2007; Chen y col., 2010). Sin embargo, el empleo de esta técnica para la detección de ADN de aves de caza y de la avicultura alternativa es más escaso. Girish y col. (2007) desarrollaron una técnica de PCR-RFLP basada en la amplificación de un fragmento de 456 pb del gen 12S ARNr para la diferenciación de carnes de codorniz, pintada, pollo, pavo y pato. La técnica permitió identificar todas las especies objeto de estudio tanto en muestras de carne cruda como en muestras sometidas a distintos tratamientos térmicos experimentales (72 °C durante 30 min, 90 °C durante 30 min, 120 °C durante 30 min y 180 °C durante 5 min). Es importante señalar que estos autores necesitaron emplear cuatro enzimas distintas para llevar a cabo la diferenciación de las cinco especies. Saini y col. (2007) llevaron a cabo la diferenciación de codorniz, pavo real, pollo, pavo y pato mediante la amplificación de un fragmento conservado de 446 pb del gen 12S ARNr y su posterior digestión con las enzimas *AluI* y *Sau3AI*. Murugaiah y col. (2009) desarrollaron también una técnica para la diferenciación de codorniz de otras especies como el pollo, vaca, cabra, cerdo, conejo y búfalo. Para ello utilizaron un ensayo basado en la digestión de un fragmento de 359 pb del gen citocromo b con cinco enzimas de restricción. No obstante, las técnicas descritas por Saini y col. (2007) y Murugaiah y col. (2009) sólo se emplearon para el análisis de muestras crudas, no evaluándose su aplicabilidad en muestras tratadas térmica-

mente. Asimismo en ninguno de los estudios descritos anteriormente se llevó a cabo el análisis de productos comerciales. Hasta donde llega nuestra información, a parte de la técnica de PCR-RFLP basada en el gen D-loop descrita en esta tesis doctoral, el único trabajo publicado hasta el momento en el que se ha empleado una técnica de PCR-RFLP para la identificación de aves de caza y de la avicultura alternativa en productos comerciales ha sido el desarrollado por Stamoulis y col. (2010). Estos autores utilizaron un método basado en la digestión de un fragmento de 480 pb del gen 12S ARNr con la enzima de restricción *Acl*I, para la identificación de codorniz, faisán, perdiz griega, becada, zorzal común, avestruz, pollo, pavo, pato, oca y cerdo. El empleo de esta enzima permitió llevar a cabo la diferenciación de las once especies objeto de estudio tanto en muestras de carne cruda como en diversos productos comerciales cocinados.

La técnica de PCR-RFLP combina una buena capacidad de resolución con las características de sencillez, rapidez y bajo coste, por lo que constituye una alternativa interesante frente a otras metodologías como la secuenciación de fragmentos amplificados por PCR (PCR-secuenciación) (Brodmann y col., 2001; Colombo y col., 2004; La Neve y col., 2008). Sin embargo, una de las principales limitaciones de esta técnica es la posible presencia de polimorfismos intraespecíficos (Asensio, 2007). Aunque en nuestro trabajo no se ha detectado variabilidad intraespecífica en las dianas de restricción de las endonucleasas utilizadas tras analizar quince individuos de

cada especie, sería preciso analizar un número más elevado de muestras para garantizar la ausencia de polimorfismo intraespecífico, y siempre sería posible encontrar algún individuo que no presentara el perfil de restricción típico de su especie debido a una mutación puntual en la secuencia diana. También hay que señalar que las técnicas de PCR-RFLP descritas en este trabajo no resultarían apropiadas para el análisis de productos cárnicos que contienen varias especies en su composición como, por ejemplo, salchichas, patés, productos cárnicos picados, etc. Esto es debido a que los cebadores conservados amplificarían el ADN de todas las especies presentes en el alimento y, por tanto, los perfiles de restricción resultantes consistirían en una mezcla de patrones de bandas característicos de cada una de ellas, dificultando la interpretación de los resultados (Partis y col., 2000; Girish y col., 2005). A pesar de estas limitaciones, varios autores han aplicado con éxito la técnica de PCR-RFLP para la identificación de especies en mezclas cárnicas constituidas por dos especies animales (Ong y col., 2007; Murugaiah y col., 2009; Chen y col., 2010). No obstante, para el análisis de matrices complejas que contengan varias especies animales es preferible emplear la técnica de PCR que utiliza cebadores específicos diseñados para amplificar fragmentos de ADN de pequeño tamaño (Rodríguez y col., 2004; Arslan y col., 2006).

De los resultados obtenidos en este trabajo se puede concluir que las técnicas de PCR-RFLP desarrolladas empleando como marcadores el gen mitocondrial 12S

ARN ribosómico y el gen D-loop, constituyen una herramienta sensible y fiable para la identificación específica de carnes y productos cárnicos procedentes de codorniz, faisán, perdiz roja, perdiz chukar, pintada, urogallo, becada, paloma torcaz, paloma bravía, zorzal común y avestruz, y su diferenciación de otras especies comerciales como el pollo, pavo, pato de berbería y oca. Los patrones de bandas pueden ser especialmente útiles en el caso de tener que llevar a cabo la identificación de especies en carnes de aves de origen desconocido, en las que sólo sería necesario aplicar las técnicas de PCR-RFLP desarrolladas y comparar los perfiles de restricción con los obtenidos en este trabajo. Por ello, estas técnicas resultan muy apropiadas para análisis rutinarios en programas de control de calidad de la industria cárnica, permitiendo garantizar la autenticidad de los productos que se comercializan.

#### **IV.1.2. TÉCNICA DE PCR CON CEBADORES ESPECIE-ESPECÍFICOS**

La segunda parte de este trabajo de investigación consistió en la puesta a punto de técnicas de PCR con cebadores específicos para la identificación de carnes y productos cárnicos de codorniz, faisán, perdiz roja, perdiz chukar, perdiz moruna, perdiz pardilla, pintada, becada, paloma bravía, paloma torcaz, zorzal común, avestruz y urogallo.

Los marcadores genéticos empleados para llevar a cabo el diseño de cebadores especie-específicos fueron el gen mitocondrial 12S ARNr y la región D-loop. Estos genes presentan zonas conservadas

con regiones variables que facilitan la identificación de diferencias nucleotídicas interespecíficas. Por ello, han sido ampliamente utilizados para el desarrollo de técnicas de PCR con cebadores específicos (Dalmaso y col., 2004; Ha y col., 2006; Che Man y col., 2007; Fajardo y col., 2007b; Mane y col., 2009; Yin y col., 2009; De y col., 2011).

Para abordar el diseño de cebadores específicos, con frecuencia es necesario amplificar y secuenciar regiones comunes a varias especies utilizando cebadores universales, con el fin de localizar diferencias en las secuencias que faciliten el posterior diseño de los cebadores especie-específicos (Herman, 2001; Di Pinto y col., 2005). En este trabajo de investigación se emplearon las secuencias del gen 12S ARNr de las especies objeto de estudio obtenidas en trabajos previos (Rojas y col., 2008). Para el diseño de cebadores específicos de perdiz pardilla y cebadores que permitiesen la amplificación de un fragmento conservado en especies de perdiz del género *Alectoris* (perdiz roja, perdiz chukar y perdiz moruna), se amplificó, purificó y secuenció, con ayuda de los cebadores conservados 12S-Fw y 12S-Rev (Fajardo y col., 2006), un fragmento de aproximadamente 720 pb del gen 12S ARNr a partir del ADN extraído de perdiz pardilla y perdiz moruna. Las secuencias obtenidas se registraron en la base de datos *Genbank/EMBL* con los siguientes números de acceso: FN675565 (perdiz pardilla) y AM944502 (perdiz moruna). La alineación y análisis informático de las secuencias nucleotídicas del gen 12S ARNr permitió el diseño de parejas de cebadores para la

amplificación de fragmentos de ADN específicos de codorniz (129 pb), faisán (113 pb), perdices del género *Alectoris* (141 pb), perdiz roja (112 pb), perdiz pardilla (123 pb) y pintada (139 pb). Asimismo, también se llevó a cabo el diseño de cebadores para la amplificación de fragmentos de ADN específicos de paloma (133 pb), becada (138 pb), zorzal común (110 pb), avestruz (155 pb) y urogallo (142 pb). Conviene aclarar que los cebadores específicos de paloma se diseñaron para la amplificación de un fragmento conservado en paloma bravía y paloma torcaz. Los cebadores se diseñaron en regiones que incluían suficientes diferencias específicas de especie para poder llevar a cabo la identificación.

Por otra parte, para diseñar cebadores especie-específicos en la región D-loop, también se emplearon las secuencias de este gen obtenidas en trabajos previos para las especies objeto de estudio (Rojas y col., 2009). Para el diseño de cebadores conservados para especies de perdiz del género *Alectoris*, se amplificó, purificó y secuenció un fragmento de aproximadamente 310 pb del gen D-loop de perdiz moruna con ayuda de los cebadores conservados DloopShort-Fw y DloopShort-Rev (Rojas y col., 2009). La secuencia obtenida aparece registrada en la base de datos *Genbank/EMBL* con el número de acceso FN377855. La alineación y análisis informático de las secuencias nucleotídicas del gen D-loop permitió el diseño de parejas de cebadores para la amplificación de fragmentos de ADN específicos de paloma (147 pb), becada (127 pb) y zorzal común

(154 pb). Al igual que en el caso de los cebadores diseñados en el gen 12S ARNr, los cebadores específicos de paloma se diseñaron para la amplificación de un fragmento conservado en paloma bravía y paloma torcaz. No obstante, el alto grado de similitud entre las secuencias de la región D-loop impidió encontrar suficientes diferencias nucleotídicas que permitiesen el diseño de cebadores específicos de codorniz, faisán, perdiz y pintada. Por este motivo, se llevó a cabo la amplificación, purificación y secuenciación de un fragmento de mayor tamaño en la región mitocondrial D-loop empleando la pareja de cebadores conservados DloopLong-Fw y DloopLong-Rev. Estos cebadores se diseñaron a partir de secuencias disponibles en la base de datos *Genbank/EMBL* y permitieron la amplificación de un fragmento conservado de entre 485 y 600 pb, dependiendo de la especie analizada, coincidiendo con las observaciones de algunos autores que indican que la región D-loop es la responsable de la variación en la longitud del genoma mitocondrial de los vertebrados (Cozzi y col., 2004; Lai y col., 2006). Las secuencias obtenidas mediante el empleo de estos cebadores aparecen registradas en la base de datos *Genbank/EMBL* con los siguientes números de acceso: FN376866 (codorniz), FN376867 (faisán), FN376868 (perdiz roja), FN376869 (perdiz chukar), FN376870 (perdiz moruna), FN675590 (perdiz pardilla), FN376871 (pintada), FN376872 (pollo), FN376873 (pavo), FN376874 (pato de berbería) y FN376875 (oca). La alineación y análisis informático de estas secuencias permitió el diseño de

parejas de cebadores para la amplificación de fragmentos de ADN específicos de codorniz (96 pb), faisán (100 pb), perdices del género *Alectoris* (106 pb) y pintada (104 pb). Debido a la similitud entre las secuencias del gen D-loop de las distintas especies de perdiz analizadas en este trabajo, no fue posible diseñar cebadores específicos para perdiz roja y perdiz pardilla en este gen. Asimismo, conviene especificar que en este trabajo también se llevó a cabo el diseño de parejas de cebadores para la amplificación de fragmentos de ADN específicos de urogallo (97 pb) y avestruz (148 pb) (resultados no mostrados). Para diseñar los cebadores específicos de urogallo se amplificó, purificó y secuenció, con ayuda de los cebadores conservados DloopLong-Fw y DloopLong-Rev, un fragmento de aproximadamente 600 pb del gen D-loop a partir del ADN extraído de esta especie. La secuencia obtenida aparece registrada en la base de datos *Genbank/EMBL* con el número de acceso FN675599. Con relación al avestruz, ninguna de las dos parejas de cebadores empleadas para la amplificación de fragmentos conservados en el gen D-loop (DloopShort-Fw/DloopShort-Rev y DloopLongFw/DloopLong-Rev) generó bandas de amplificación a partir del ADN de esta especie. No obstante, el elevado número de secuencias de este gen disponibles en la base de datos *Genbank/EMBL* para el avestruz, proporcionó información suficiente para poder llevar a cabo el diseño de una pareja de cebadores específicos para esta especie.

El tamaño de los amplicones obtenidos en cada especie coincidió con el

esperado según el estudio de las secuencias de los genes 12S ARNr y D-loop. El análisis de muestras procedentes de al menos quince individuos de cada especie objeto de estudio con sus respectivos cebadores específicos permitió determinar la reproducibilidad de los ensayos. La especificidad de los cebadores diseñados se confirmó mediante la amplificación por PCR del ADN extraído a partir de especies animales distintas de la especie objeto de análisis. Todas las parejas de cebadores diseñadas demostraron ser específicas frente a la especie diana correspondiente, no originando bandas de amplificación a partir del ADN de otros animales (*Tabla 2*, pág. 106, para los cebadores de codorniz, faisán, perdices del género *Alectoris* y pintada diseñados en el gen 12S ARNr; *Tabla 2*, pág. 117, para los cebadores de codorniz, faisán, perdices del género *Alectoris*, pintada, becada, paloma y zorzal común diseñados en el gen D-loop; *Figura 2*, pág. 129, para los cebadores de perdiz roja y perdiz pardilla; resultados no mostrados para los cebadores de becada, paloma, zorzal común, urogallo y avestruz diseñados en el gen 12S ARNr, y para los cebadores de urogallo y avestruz diseñados en el gen D-loop).

En la mayoría de los trabajos publicados en los que se utilizan cebadores específicos para la detección de especies en carnes y productos cárnicos, la especificidad de los cebadores se determina frente a un número reducido de especies animales (Colombo y col., 2002; Losio y col., 2004; Kesmen y col., 2007; Tanabe y col., 2007). No obstante, los productos cárnicos



elaborados en la industria alimentaria pueden contener entre sus ingredientes tejidos procedentes de una gran variedad de animales (pollo, pavo, pato, cerdo, vaca, oveja, cabra, etc.). Comprobar la especificidad de los cebadores frente a un número elevado de especies es muy importante puesto que disminuye el riesgo de encontrar reactividad cruzada con especies no analizadas, lo cual limitaría la utilidad del ensayo para análisis rutinarios (Martín y col., 2007a). En este trabajo, la especificidad de todos los cebadores diseñados ha sido probada frente a un número elevado de especies animales entre las que se incluyen varias especies de aves y mamíferos, tanto de caza como domésticos.

Un problema que puede afectar a los protocolos de PCR deriva de posibles fallos en la amplificación del ADN debido a la presencia de sustancias inhibitoras en las muestras. El fenómeno de inhibición puede disminuir o incluso impedir por completo la amplificación por PCR, dando lugar a falsos resultados negativos (Wilson, 1997). En este sentido, el Comité Europeo de Estandarización, en colaboración con la ISO (Organización Internacional para la Estandarización), ha propuesto unas pautas generales para los ensayos de PCR que incluyen el requerimiento de utilizar un control interno en cada reacción de PCR que evite una mala interpretación de aquellos resultados de amplificación negativa que puedan deberse a fenómenos de inhibición (Lund y Madsen, 2006). Teniendo en cuenta estas recomendaciones, todas las muestras analizadas con los cebadores específicos se examinaron simultáneamente con las

parejas de cebadores conservados 18SEu-Fw/18SEu-Rev o 18SpEu-Dir/18SpEu-Inv, que amplifican fragmentos de 89 y 141 pb, respectivamente, del gen nuclear 18S ARNr en todos los organismos eucariotas. Estos cebadores se diseñaron mediante la comparación de las secuencias del gen nuclear 18S ARNr disponibles en la base de datos *Genbank/EMBL* para varias especies de aves y mamíferos. Los resultados obtenidos confirmaron la utilidad de ambas parejas de cebadores conservados como controles positivos de amplificación (*Tabla 2*, pág. 106, para codorniz, faisán, perdices del género *Alectoris* y pintada en el gen 12S ARNr; *Tabla 2*, pág. 117, para codorniz, faisán, perdices del género *Alectoris*, pintada, becauda, paloma y zorzal en el gen D-loop; *Figura 2*, pág. 129, para perdiz roja y perdiz pardilla; resultados no mostrados para becauda, paloma, zorzal común, urogallo y avestruz en el gen 12S ARNr, y para urogallo y avestruz en el gen D-loop).

Una vez demostrada la correcta amplificación del ADN en muestras cárnicas crudas, se comprobó la influencia del procesado en la capacidad de las técnicas de PCR desarrolladas para detectar las especies de interés. Para ello se analizaron muestras cárnicas de las especies objeto de estudio sometidas a tratamientos experimentales de pasteurización (72 °C durante 30 min) y esterilización (121 °C durante 20 min). La integridad del ADN extraído a partir de las muestras crudas y tratadas térmicamente, se valoró mediante electroforesis en gel de agarosa D-1 al 1 %. En las muestras crudas y pasteurizadas se obtuvieron ADNs íntegros y de un peso

molecular elevado, mientras que los ADNs extraídos a partir de las muestras esterilizadas presentaron un patrón típico de degradación y un bajo peso molecular (*Figura 3*, pág. 107, para codorniz, faisán, perdiz roja y pintada; resultados no mostrados para el resto de especies). No obstante, a pesar de la degradación del ADN, el empleo de los cebadores específicos diseñados permitió la amplificación satisfactoria de todas las muestras, tanto crudas como tratadas térmicamente (*Figura 4*, pág. 107, para codorniz, faisán, perdices del género *Alectoris* y pintada en el gen 12S ARNr; *Figura 3*, pág. 118, para codorniz, faisán, perdices del género *Alectoris*, pintada, becada, paloma y zorzal común en el gen D-loop; resultados no mostrados para perdiz roja, perdiz pardilla, becada, paloma, zorzal común, avestruz y urogallo en el gen 12S ARNr, y para avestruz y urogallo en el gen D-loop).

El límite de detección de las técnicas de PCR se determinó mediante la amplificación del ADN obtenido a partir de mezclas binarias experimentales que contenían distintos porcentajes de la especie diana en una matriz cárnica de pollo. Las mezclas binarias se analizaron crudas y tras someterse a un tratamiento térmico de esterilización (121 °C durante 20 min). El límite de detección conseguido en todas las mezclas binarias analizadas con cada una de las parejas de cebadores específicos fue del 0,1 %, tanto en las mezclas crudas como en las esterilizadas (*Figura 5*, pág. 108, para codorniz, faisán, perdices del género *Alectoris* y pintada en el gen 12S ARNr; *Figuras 4 y 5*, pág. 119, para codorniz, faisán,

perdices del género *Alectoris*, pintada, becada, paloma y zorzal común en el gen D-loop; *Figura 3*, pág. 130, para perdiz roja; resultados no mostrados para perdiz pardilla, becada, paloma, zorzal común, avestruz y urogallo en el gen 12S ARNr, y para avestruz y urogallo en el gen D-loop). Los resultados demuestran que las técnicas de PCR desarrolladas son capaces de detectar bajos porcentajes de sustitución de la especie diana (0,1 %), incluso en aquellas muestras sometidas a tratamientos térmicos intensos.

Muchas de las técnicas de PCR con cebadores específicos desarrolladas para la identificación de especies en los alimentos se han centrado en el análisis de carnes y mezclas cárnicas experimentales crudas o tratadas térmicamente (Hopwood y col., 1999; Fajardo y col., 2007b; Ilhak y Arslan, 2007b; Martín y col., 2007a; Bai y col., 2009; Yin y col., 2009). Sin embargo, la aplicación de estas técnicas al análisis de productos cárnicos comerciales, en los que se combinan diferentes ingredientes y tratamientos de procesado, es más escasa (Che Man y col., 2007; Fujimura y col., 2008; Ghovvati y col., 2009; Zha y col., 2010). En este trabajo se analizaron diversos productos comerciales (estofados, patés, conservas escabechadas, etc.) que contenían carne de las especies diana. En la mayoría de los casos, los resultados obtenidos revelaron que el origen de las muestras analizadas coincidía con la especie descrita en el etiquetado del producto. Sin embargo, en varias muestras de paté de perdiz no se obtuvo amplificación con los cebadores específicos correspondientes

(Tabla 3, pág. 120; Tabla 2, pág. 130). Conviene señalar que las muestras de paté en las que no se obtuvo amplificación con los cebadores específicos diseñados en el gen D-loop fueron las mismas que no se amplificaron con los cebadores específicos del gen 12S ARNr. No obstante, estas muestras sí se amplificaron correctamente con los cebadores empleados como control positivo de amplificación, lo cual podría indicar un fraude en el etiquetado de estos productos. Asimismo, diversas conservas etiquetadas como carne de perdiz roja no se amplificaron con los cebadores específicos de perdiz roja, aunque sí se obtuvo amplificación con los cebadores específicos para especies de perdiz del género *Alectoris*, así como con los cebadores empleados como control positivo de amplificación. Estos resultados podrían deberse a un posible fraude derivado de la sustitución de perdiz roja por otras perdices del género *Alectoris*.

Por otra parte, las técnicas desarrolladas también se emplearon para llevar a cabo el análisis de piensos destinados a la alimentación de animales de compañía. En los últimos años, han surgido en el mercado numerosas preparaciones para perros y gatos que incluyen entre sus ingredientes carne de especies novedosas como la codorniz, faisán y avestruz. Estas especies animales se emplean fundamentalmente en piensos *gourmet* y en piensos destinados a la alimentación de animales que presentan algún tipo de alergia alimentaria. Estudios recientes han demostrado que los ingredientes empleados normalmente en la elaboración de los piensos (lácteos, pollo, soja, huevos, trigo,

maíz y pescado) son los principales alimentos predisponentes a fenómenos alérgicos en perros y gatos. Por ello, las carnes de faisán, codorniz y avestruz constituyen una excelente fuente de proteínas alternativa para la preparación de fórmulas hipoalergénicas, ya que estas especies no se incluyen en los alimentos convencionales para perros y gatos. El empleo de los cebadores específicos de codorniz, faisán y avestruz diseñados en el gen 12S ARNr, permitió la detección de las especies diana en todos los productos analizados, excepto en varios piensos para perro etiquetados como carne de faisán en los que no se detectó su presencia (Tabla 2, págs. 138 y 139). Sin embargo, estas muestras sí se amplificaron con los cebadores empleados como control positivo de amplificación, lo cual podría indicar un fraude en el etiquetado de los piensos.

Los resultados obtenidos ponen de manifiesto que las técnicas de PCR desarrolladas constituyen una herramienta útil para el análisis de autenticidad de productos cárnicos y piensos de las especies diana, incluso si los productos analizados han sido sometidos a tratamientos térmicos intensos, como las conservas o los piensos, o presentan en su composición diversos ingredientes mezclados con bajos porcentajes de la especie diana, como sucede en los patés.

Al igual que en el caso de las técnicas de PCR-RFLP, la mayoría de los trabajos publicados para la identificación de especies en productos cárnicos mediante el empleo de cebadores específicos se han

centrado principalmente en la identificación de especies domésticas o mamíferos de caza (Herman y col., 2001; Colombo y col., 2002; Hird y col., 2003; Rodríguez y col., 2004; Köppel y col., 2009). Sin embargo, son muy escasas las técnicas de PCR con cebadores específicos desarrolladas para la identificación de aves de caza y de la avicultura alternativa. Stirtzel y col. (2007) desarrollaron una técnica de PCR para la detección de carne de codorniz, pintada y faisán, utilizando cebadores específicos diseñados en el gen mitocondrial citocromo b. Estos cebadores permitieron la amplificación de fragmentos específicos de codorniz, faisán y pintada de 187, 164 y 192 pb, respectivamente, tanto en muestras de carne cruda como en diversos productos comerciales tratados térmicamente. No obstante, el límite de detección de la técnica no fue determinado. Nau y col. (2009) diseñaron una pareja de cebadores que amplificaba un fragmento de 641 pb en el gen mitocondrial citocromo b para la detección e identificación por PCR de huevo de pintada. La sensibilidad de la técnica se evaluó mediante el análisis de ADN extraído de distintas mezclas de huevo de pintada con huevos de pollo, pavo y pato, tanto líquidos como deshidratados, obteniéndose un límite de detección del 0,1 % en ambos casos. Sin embargo, no se comprobó la aplicabilidad del ensayo para el análisis de muestras de huevo sometidas a tratamientos térmicos intensos ni para el análisis de carnes y productos cárnicos. El gen citocromo b también se empleó como marcador genético por Haunshi y col. (2009) para llevar a cabo el diseño de una pareja de

cebadores específicos de paloma. Los cebadores diseñados amplificaron un fragmento específico de 401 pb a partir del ADN extraído de carne de paloma cruda, y tratada a 80 °C durante 30 min y a 120 °C durante 20 min. Sin embargo, estos autores no determinaron el límite de detección de la técnica ni evaluaron la capacidad de los cebadores para la detección de paloma en productos cárnicos comerciales. Colombo y col. (2000) diseñaron una pareja de cebadores para la amplificación de un fragmento específico de avestruz de 534 pb en el gen citocromo b. El empleo de los cebadores permitió la detección de avestruz en muestras de carne cruda pero no se comprobó su utilidad para el análisis de carnes tratadas térmicamente y productos cárnicos comerciales. No obstante, el elevado tamaño del fragmento diana (534 pb), limita la aplicabilidad de estos cebadores para el análisis de muestras sometidas a tratamientos térmicos intensos. En cuanto a la detección de ADN de becada, zorzal común y urogallo, hasta donde llega nuestra información no existen estudios previos que aborden la identificación de estas especies mediante el empleo de cebadores especie-específicos. Tampoco se han encontrado trabajos previos que utilicen cebadores específicos para la identificación de perdiz roja, perdiz chukar, perdiz moruna y perdiz pardilla, ni para la detección de aves de caza y de la avicultura alternativa en piensos para animales de compañía. En esta tesis doctoral, las técnicas de PCR desarrolladas permiten detectar hasta un 0,1 % de ADN procedente de doce especies de aves de caza y de la avicultura alternativa

diferentes. Asimismo, se ha demostrado la aplicabilidad de los ensayos para la identificación de las especies objeto de estudio en muestras de carne sometidas a tratamientos térmicos experimentales, productos cárnicos comerciales y piensos.

En resumen, las técnicas de PCR empleando cebadores específicos de especie diseñados en los genes mitocondriales 12S ARNr y D-loop, constituyen una herramienta eficaz para asegurar el cumplimiento de las normas de etiquetado y garantizar la autenticidad de la carne y productos cárnicos de aves de caza y de la avicultura alternativa. Las técnicas desarrolladas combinan rapidez, sensibilidad y bajo coste, lo que las convierte en una alternativa interesante a otras técnicas basadas en el análisis del ADN, como la secuenciación o los métodos de PCR-RFLP, para su aplicación como método rutinario de identificación de especies.

A pesar de las ventajas que presentan las técnicas de PCR descritas anteriormente, una de las principales limitaciones asociadas al empleo de genes mitocondriales como marcadores genéticos deriva de la imposibilidad de diferenciar individuos genéticamente puros de individuos híbridos, debido a que el ADN mitocondrial se hereda únicamente por vía materna. No obstante, en la mayor parte de las especies analizadas en este trabajo esta limitación no supone un inconveniente, puesto que la pureza genética de los individuos no influye en el valor económico y el etiquetado de la carne y productos cárnicos derivados de los mismos. Además,

en casi todas las especies analizadas, los ejemplares objeto de caza presentes en la naturaleza, así como los individuos empleados para producción cárnica en granjas, no suelen hibridar con otras especies. Sin embargo, la imposibilidad de detectar individuos híbridos sí supone una limitación para el análisis de carnes y productos cárnicos de perdiz roja. Por un lado, en el caso de la perdiz roja, son frecuentes las hibridaciones con otras especies de perdiz, fundamentalmente con la especie perdiz chukar. Estos cruces se llevan a cabo de forma controlada en algunas granjas de producción de perdiz roja para carne con el objetivo de mejorar la productividad de los animales y conseguir una mejor adaptación a la cautividad. Conviene recordar que esta técnica está estrictamente prohibida en las explotaciones que producen perdices con fines cinegéticos puesto que sólo pueden ser liberados en el campo ejemplares puros de perdiz roja (Ley 42/2007, de 13 de diciembre de 2007, del Patrimonio Natural y de la Biodiversidad (BOE de 14 de diciembre de 2007)). Por otra parte, el valor económico y el etiquetado de la carne y productos cárnicos de perdiz roja son variables dependiendo de la genética de los individuos empleados para su elaboración. En este sentido, las carnes de perdiz roja pueden presentar dos tipos de denominaciones: “carne de perdiz roja” y “carne de perdiz roja de caza”. De ellos, los productos etiquetados como “carne de perdiz roja de caza” son los que presentan un mayor valor económico. En cuanto a las especies de perdiz utilizadas en cada uno de estos productos, tanto los ejemplares de

perdiz roja puros, como los híbridos resultantes de cruces industriales de perdiz roja con perdiz chukar pueden ser etiquetados como “carne de perdiz roja”. En cambio, teniendo en cuenta que, en teoría, las perdices rojas presentes en la naturaleza corresponden a ejemplares puros, las carnes y productos etiquetados como “perdiz roja de caza” sólo pueden corresponder a individuos puros y no a perdices híbridas. Considerando estos aspectos, el empleo de los cebadores específicos de perdiz roja diseñados en el gen 12S ARNr presenta limitaciones para el análisis de autenticidad de productos cárnicos de perdiz roja puesto que no permite detectar aquellos individuos etiquetados como “carne de perdiz roja” resultantes de cruces entre hembras chukar y machos de perdiz roja, y tampoco permite determinar si las perdices rojas empleadas en la elaboración de los productos etiquetados como “carne de perdiz roja de caza” corresponden a individuos puros o a híbridos resultantes de cruces entre hembras de perdiz roja y machos de perdiz chukar. Por este motivo, en esta tesis doctoral se procedió a la búsqueda de un método complementario que permitiese llevar a cabo la diferenciación de perdices rojas puras e híbridas.

Entre las técnicas genéticas más utilizadas para llevar a cabo estudios de hibridación entre especies, destacan aquellas basadas en el análisis del polimorfismo del ADN amplificado con cebadores arbitrarios (RAPD) (Jug y col., 2004; Chelomina y col., 2008), el análisis del polimorfismo en la longitud de los fragmentos amplificados por PCR (AFLP)

(Alves y col., 2002; Nijman y col., 2003), el análisis del polimorfismo en la longitud de fragmentos de restricción (RFLP) (Nijman y col., 2002; Verkaar y col., 2002), el análisis de marcadores microsatélites (STR) (Williams y col., 2005; Fowler y col., 2009; Lühken y col., 2009) y el análisis de polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) (Fajardo y col., 2008; Simmons y col., 2010). Con relación a la detección de hibridación en la perdiz roja, se han desarrollado diversas técnicas genéticas basadas principalmente en el estudio de marcadores de tipo microsatélite, en la metodología RAPD y en la caracterización de SNPs específicos de especie localizados en genes nucleares. Los marcadores microsatélites son muy útiles en estudios de caracterización genética de poblaciones y han sido empleados por numerosos autores para detectar la introgresión de genes de perdiz chukar en poblaciones de perdiz roja. Baratti y col. (2005) detectaron la presencia de genes de perdiz chukar en una población de perdiz roja situada en Italia, mediante el empleo de diez marcadores microsatélites. De forma similar, Barilani y col. (2007) demostraron la existencia de introgresión de perdiz chukar en una población de perdiz roja situada en los Alpes franceses mediante el empleo de ocho marcadores microsatélites. Tejedor y col. (2007) utilizaron siete marcadores microsatélites para caracterizar una población de perdiz roja localizada en la isla de Mallorca. Los resultados obtenidos demostraron que la población de perdiz roja analizada había sufrido hibridación con perdices chukar. En cuanto a la metodología RAPD, se han publicado numerosos



estudios en los que esta técnica ha permitido la diferenciación de individuos de perdiz roja y perdiz chukar puros, e híbridos resultantes de cruces entre ambas especies. Barbanera y col. (2005) desarrollaron una técnica basada en el empleo de cuatro cebadores arbitrarios para llevar a cabo la detección de individuos híbridos en poblaciones de perdiz roja localizadas en Italia central. El análisis de perdices rojas y perdices chukar puras con los cebadores seleccionados generó diversas bandas especie-específicas que fueron utilizadas como bandas diagnósticas para la identificación de ejemplares híbridos. Posteriormente, estos autores emplearon la misma técnica para la detección de hibridación en poblaciones de perdiz chukar y perdiz roja localizadas en España, Italia, Grecia y Chipre (Barbanera y col., 2007, 2009). Además del análisis de microsatélites y el análisis RAPD, varios autores han detectado polimorfismos de una base nucleotídica (SNP) en diversos genes nucleares de perdiz roja y perdiz chukar que también pueden ser empleados para la identificación de híbridos. García y Arruga (2006a) detectaron la presencia de dos SNPs ínterespecíficos entre perdiz roja y perdiz chukar en un fragmento de 290 pb del gen nuclear de la hormona del crecimiento. En el caso de la perdiz roja, los nucleótidos presentes en las posiciones 109 y 204 del fragmento correspondían a citosina (C) y guanina (G), mientras que en la perdiz chukar, los nucleótidos presentes en estas posiciones eran timina (T) y adenina (A). Teniendo en cuenta que los genes nucleares se heredan de forma biparental, puede suponerse que los individuos resultantes de

cruces entre perdiz roja y perdiz chukar presentarán los dimorfismos C/T y G/A en las posiciones diagnósticas. Por lo tanto, el análisis de los SNPs presentes en el gen de la hormona del crecimiento podría ser empleado como método para la discriminación entre perdices rojas puras e híbridas. No obstante, cabe resaltar que los autores no comprobaron experimentalmente la presencia de los dimorfismos C/T y G/A en el gen de la hormona del crecimiento de perdices híbridas puesto que sólo llevaron a cabo el análisis de perdices rojas y perdices chukar puras. Por otra parte, Arruga y col. (2007a) identificaron la presencia de un SNP entre perdiz roja y perdiz chukar en un fragmento de 441 pb del intron 1 del gen nuclear que codifica para la rodopsina, consistente en un cambio de timina (T) por citosina (C) en la posición 87. Los individuos resultantes de cruces entre perdiz roja y perdiz chukar presentaban ambos nucleótidos en la misma posición. La utilización de una técnica de PCR-RFLP empleando enzimas cuya diana de restricción se localizaba en esta posición permitió la diferenciación entre perdices rojas puras e híbridas.

Tras evaluar las técnicas anteriormente descritas, en este trabajo se seleccionó la metodología RAPD desarrollada por Barbanera y col. (2005), así como las dos técnicas basadas en la detección de SNPs descritas por García y Arruga (2006a) y Arruga y col. (2007a), como posibles métodos complementarios a los cebadores específicos diseñados en el gen 12S ARNr para llevar a cabo el análisis de autenticidad de carnes y productos cárnicos de perdiz

roja. El empleo de la técnica de RAPD descrita por Barbanera y col. (2005) generó bandas específicas en muestras de perdiz roja y perdiz chukar crudas. No obstante, la técnica no resultó adecuada para el análisis de muestras tratadas térmicamente puesto que los cebadores arbitrarios empleados no produjeron ninguna banda de amplificación en estas muestras (*Figura 4*, pág. 132). Con relación al método descrito por García y Arruga (2006a), no fue posible amplificar el fragmento de 290 pb del gen de la hormona del crecimiento en muestras tratadas térmicamente por lo que se diseñó una pareja de cebadores que amplificase un fragmento de menor tamaño en el que estuviesen contenidos los SNPs diagnósticos. El diseño de los cebadores se llevó a cabo mediante la comparación de las secuencias del gen de la hormona del crecimiento disponibles en la base de datos *Genbank/EMBL* para perdiz roja y perdiz chukar. Los cebadores diseñados permitieron la amplificación de un fragmento de 153 pb en todas las muestras analizadas, tanto crudas como tratadas térmicamente. Una vez amplificado el ADN, se purificó y secuenció el fragmento de 153 pb en muestras correspondientes a perdiz roja y perdiz chukar puras. Las secuencias obtenidas aparecen registradas en la base de datos *Genbank/EMBL* con los siguientes números de acceso: FN675619-FN675631, FN811169, FN811170 (perdices rojas); FN675632-FN675640, FN811171-FN811176 (perdices chukar). El análisis y comparación de las secuencias obtenidas reveló la presencia de los SNPs diagnósticos descritos por García y Arruga (2006a) en la

mayoría de las perdices rojas puras y perdices chukar puras analizadas. Sin embargo, algunos individuos puros presentaban dimorfismos C/T o G/A en una de las posiciones diagnósticas. La aparición de estos dimorfismos puede deberse a la ocurrencia de mutaciones puntuales en las posiciones diagnósticas, lo cual limitaría la aplicación de la técnica para la detección de ejemplares híbridos.

Por último, se evaluó la aplicabilidad del método basado en la detección de un SNP del gen de la rodopsina descrito por Arruga y col. (2007a). En primer lugar, se diseñó una pareja de cebadores para la amplificación de un fragmento de 110 pb del gen de la rodopsina, que contenía el SNP diagnóstico. El empleo de los cebadores diseñados permitió la amplificación del fragmento esperado tanto en muestras crudas como tratadas térmicamente. Posteriormente, se purificó y secuenció el fragmento de 110 pb en muestras correspondientes a perdiz roja y perdiz chukar puras. Las secuencias obtenidas aparecen registradas en la base de datos *Genbank/EMBL* con los siguientes números de acceso: FN675770-FN675784 (perdices rojas); FN675760-FN675769, FN811177-FN811181 (perdices chukar). Tras llevar a cabo un análisis y comparación de las secuencias obtenidas se comprobó que todas las secuencias correspondientes a ejemplares de perdiz roja pura presentaban el nucleótido timina (T) en la posición diagnóstica descrita por Arruga y col. (2007a), mientras que en todas las perdices chukar puras analizadas, el nucleótido presente en esta posición correspondía a

citosa (C). Teniendo en cuenta estos resultados se procedió a la purificación y secuenciación de los productos de PCR obtenidos a partir de productos comerciales etiquetados como carne de perdiz roja. Las secuencias generadas a partir de estos productos comerciales aparecen registradas en la base de datos con los siguientes números de acceso: FN675785-FN675787, FN811344-FN811356, FN811182. Los resultados obtenidos tras el análisis de las secuencias aparecen recogidos en la *Tabla 3*, pág. 133. Todos los productos comerciales que habían sido amplificados por los cebadores específicos de perdiz roja diseñados en el gen mitocondrial 12S ARNr presentaron en la posición diagnóstica del gen de la rodopsina el nucleótido T, lo que permitió confirmar la presencia de perdiz roja pura en el producto. Con relación a los productos etiquetados como perdiz roja que no habían sido amplificados por los cebadores específicos de perdiz roja, la mayoría presentaron el nucleótido C, característico de perdiz chukar. Estos resultados confirman la presencia de perdiz chukar pura en el producto, lo cual revelaría la existencia de un fraude en el etiquetado. Por último, dos de las muestras etiquetadas como carne de perdiz roja que no habían sido amplificadas con los cebadores específicos de perdiz roja, presentaron el dimorfismo T/C en el gen de la rodopsina, lo que indicaría la presencia de ejemplares híbridos en estos productos. Cabe resaltar que, puesto que no se detectó la presencia de ADN de perdiz roja en el genoma mitocondrial, los ejemplares híbridos presentes en estos productos correspon-

derían a individuos resultantes de cruces entre machos de perdiz roja y hembras de perdiz chukar.

Los resultados obtenidos demuestran que el empleo combinado de cebadores específicos de perdiz roja diseñados en el gen mitocondrial 12S ARNr y la detección mediante secuenciación de un SNP descrito por Arruga y col. (2007a) en el gen de la rodopsina, pueden constituir una herramienta útil para el análisis de autenticidad de carnes y productos cárnicos de perdiz roja. No obstante, debe aclararse que el ensayo basado en el gen de la rodopsina presenta varias limitaciones. Por un lado, esta técnica no puede ser empleada para el análisis de productos que contienen varias especies animales en su composición, puesto que los cebadores empleados para llevar a cabo la técnica amplifican otras especies como, por ejemplo, la codorniz. Por tanto, si estas especies están presentes en la mezcla analizada, los cromatogramas obtenidos tras la secuenciación de los productos de PCR amplificados consistirían en una mezcla de secuencias correspondientes a cada una de las especies amplificadas, lo que dificultaría la interpretación de los resultados. Asimismo, la utilización de un solo marcador genético consistente en un polimorfismo de una única base nucleotídica para la detección de perdeses híbridas puede resultar problemático puesto que siempre sería posible encontrar algún individuo de perdiz roja o perdiz chukar que no presentara el nucleótido típico de su especie debido a una mutación puntual. Por ello, sería necesario disponer de un mayor número de marcadores genéticos para poder llevar a cabo de

una forma fiable la diferenciación de perdices rojas puras e híbridas.

#### **IV.1.3. TÉCNICA DE PCR EN TIEMPO REAL**

En la actualidad, las técnicas de PCR convencionales que se desarrollan en varios pasos, desde la amplificación del material genético hasta el análisis de los productos finales, están evolucionando hacia procedimientos más rápidos y automatizados en un solo tubo. Estas técnicas se basan en el uso de equipos de PCR con detección espectrofluorimétrica con los que es posible realizar un seguimiento en tiempo real del proceso de amplificación del ADN. En los sistemas de PCR en tiempo real, un programa informático va registrando el incremento de fluorescencia, que es proporcional al aumento de ADN en cada ciclo, y esta información se refleja gráficamente en curvas de cinética de la reacción o curvas de amplificación. Para cada muestra, el programa informático calcula el número de ciclo en el que el lector empieza a detectar un incremento de fluorescencia significativo con respecto a la señal base. El ciclo en el que empieza a detectar el aumento de fluorescencia se denomina ciclo umbral ( $C_t$ , *Threshold Cycle*) o punto de corte ( $C_p$ , *Crossing Point*) y es inversamente proporcional a la concentración inicial de ADN diana presente en la muestra. Así, cuanto mayor sea el número inicial de copias del ácido nucleico diana, antes se detectará un incremento en la fluorescencia como consecuencia del acúmulo de productos de PCR. Una de las principales ventajas de esta metodología es

que proporciona un resultado numérico en tiempo real que permite la cuantificación de las especies de interés y el tratamiento estadístico de los datos obtenidos (Brodmann y Moor, 2003; Frezza y col., 2003; Costa, 2004).

Como último objetivo de esta tesis doctoral se planteó el desarrollo de técnicas de PCR en tiempo real para la detección y cuantificación de ADN de codorniz, faisán, perdiz, pintada, paloma bravía, paloma torcaz, paloma zurita, becada, zorzal común, avestruz y urogallo, en carne, mezclas cárnicas y productos cárnicos comerciales. Los procedimientos de PCR en tiempo real se llevaron a cabo en la plataforma de detección *LightCycler* 2.0 de Roche Diagnostics (Mannheim, Alemania) que está equipada con la tecnología más innovadora para cuantificar los productos de PCR amplificados. Este equipo utiliza tubos capilares para 20 y 100  $\mu$ L, lo que posibilita el trabajo con distintos volúmenes de reacción. Además, dispone de seis canales de detección a longitudes de onda de 530, 560, 610, 640, 670 y 710 nm, que le permiten trabajar con distintos tipos de moléculas fluorescentes.

En este trabajo se emplearon como diana de detección fragmentos específicos de pequeño tamaño del gen mitocondrial 12S ARN ribosómico de las especies de interés. La selección de amplicones de pequeño tamaño es un factor especialmente crítico para el éxito de los ensayos de PCR en tiempo real, sobre todo en el análisis de productos cárnicos donde el ADN puede estar degradado (Hird y col., 2006). Por esta

razón, conviene seleccionar cebadores que amplifiquen fragmentos con un tamaño comprendido entre 50 y 200 pb, ya que los amplicones pequeños proporcionan una alta eficiencia al ensayo y son adecuados para el análisis de muestras sometidas a tratamientos térmicos muy intensos que degradan el ADN (Krcmar y Rencova, 2005). Para la detección y cuantificación de ADN de codorniz, faisán, perdiz, pintada, paloma, becada, zorzal común, urogallo y avestruz, se utilizaron las parejas de cebadores diseñados previamente en esta tesis doctoral para el análisis de autenticidad de carne y productos cárnicos de las correspondientes especies diana mediante PCR convencional (ver sección IV.1.2.). Conviene señalar que, en el caso de la técnica de PCR en tiempo real para la detección y cuantificación de perdiz, sólo se utilizó la pareja de cebadores conservados para perdices del género *Alectoris*. Para el análisis por PCR en tiempo real de carnes y productos cárnicos de paloma bravía, paloma torcaz y paloma zurita se procedió al diseño de parejas de cebadores específicos para cada una de estas especies. Además, se diseñó una nueva pareja de cebadores conservados para la amplificación de las tres especies de paloma, puesto que la pareja de cebadores diseñados previamente para el análisis de carnes de paloma mediante PCR convencional sólo permitía la amplificación de las especies paloma bravía y paloma torcaz. El diseño de los cebadores se realizó mediante la comparación y el análisis informático de las secuencias del gen 12S ARNr de las especies objeto de estudio obtenidas en trabajos previos (Rojas y col., 2008). Para

llevar a cabo el diseño de los cebadores específicos de paloma zurita, se amplificó, purificó y secuenció, con ayuda de los cebadores conservados 12S-Fw y 12S-Rev (Fajardo y col., 2006), un fragmento de aproximadamente 720 pb del gen 12S ARNr a partir del ADN extraído de esta especie. Las secuencia obtenida aparece registrada en la base de datos *Genbank/EMBL* con el número de acceso FN675565.

Además de los cebadores específicos, se empleó la pareja de cebadores universales de eucariotas 18SpEu-Dir y 18SpEu-Inv diseñados en trabajos previos (Rojas y col., 2010). Estos cebadores se utilizaron como control positivo de amplificación y como control endógeno para normalizar los valores de  $C_p$  obtenidos en las reacciones de PCR específicas. La principal ventaja del empleo de un sistema de PCR endógeno radica en que determinados factores que afectan al nivel de amplificación del ensayo, como son la presencia de inhibidores de la reacción o la integridad y la calidad del ADN recuperado de una muestra, se pueden ajustar al comparar el valor de  $C_p$  obtenido en la muestra problema con la respuesta de amplificación obtenida con los sistemas de PCR específicos. Este hecho tiene un enorme interés dada la variabilidad observada en los resultados de amplificación del ADN a partir de matrices alimentarias en función de factores como el estado de conservación y el tratamiento de procesado aplicado al producto (López-Andreo y col., 2005).

La detección de los productos amplificados mediante PCR en tiempo real

se realizó mediante el empleo de dos tipos de moléculas fluorescentes: el agente fluorescente inespecífico SYBR<sup>®</sup> Green y sondas específicas TaqMan<sup>®</sup>. El SYBR<sup>®</sup> Green es un fluorocromo que se intercala entre las hebras de la doble hélice de ADN, independientemente de su secuencia de nucleótidos. Si el producto de amplificación es específico, el aumento en la fluorescencia es proporcional al número de copias presentes inicialmente en la muestra (Sawyer y col., 2003). No obstante, como el SYBR<sup>®</sup> Green se une a cualquier molécula de ADN bicatenaria, las amplificaciones inespecíficas o la formación de dímeros de cebadores pueden originar falsos positivos. Por ello, es necesario llevar a cabo un análisis de la curva de desnaturalización térmica (curva de *melting*) una vez finalizados los ciclos de amplificación, para poder identificar el producto de PCR que ha sido detectado y confirmar su especificidad (Aarts y col., 2006). Aunque en los artículos incluidos en esta tesis doctoral sólo se hace referencia a la utilización de SYBR<sup>®</sup> Green como molécula fluorescente en los sistemas desarrollados para la identificación de avestruz y urogallo, este fluorocromo también se empleó para llevar a cabo la identificación del resto de especies objeto de estudio.

A diferencia del reactivo SYBR<sup>®</sup> Green, las sondas TaqMan<sup>®</sup> son oligonucleótidos marcados con fluorocromos en los dos extremos, que son capaces de hibridar en regiones internas y específicas de la secuencia del ADN diana, evitando falsos positivos si se generan productos de PCR inespecíficos o dímeros de cebadores. El

fluorocromo situado en el extremo 5' se llama donador (*reporter*) y el del extremo 3' recibe el nombre de aceptor (*quencher*). Cuando la sonda (que se incluye en la reacción de PCR conjuntamente con los cebadores) está íntegra, la proximidad del donador y del aceptor provoca un fenómeno denominado FRET (transferencia de energía de resonancia de Förster o transferencia de energía de resonancia fluorescente), que se traduce en la anulación de la fluorescencia de la sonda. En el curso de la PCR, la sonda se une a su secuencia diana cuando se encuentra presente en la reacción. Durante la extensión de la cadena de ADN, la actividad 5' exonucleasa de la enzima Taq polimerasa provoca la liberación del donador del extremo 5' de la sonda, que al separarse del aceptor comienza a emitir fluorescencia. La acumulación de los productos de PCR se detecta monitorizando el aumento de fluorescencia por la liberación del donador (Dooley y col., 2004; López-Calleja y col., 2007). En los últimos años, han surgido sondas TaqMan<sup>®</sup> MGB de nueva generación. Estas sondas presentan como innovación la incorporación de una molécula llamada MGB (*Minor Groove Binder*) que se une al surco menor del ADN, incrementando la estabilidad y especificidad de la hibridación de la sonda, así como el empleo de un *quencher* no fluorescente (NFQ) que emite una señal más limpia, mejorando la discriminación y facilitando la interpretación de los datos. Las principales ventajas de las sondas MGB cuando se emplean en PCR en tiempo real se deben a su mayor especificidad de hibridación, que permite una mayor discriminación, y a su pequeño tamaño, que



facilita el diseño de los ensayos y la reducción del tamaño del amplicón, lo que mejora la fiabilidad del trabajo.

El diseño de las sondas TaqMan® empleadas en este trabajo se llevó a cabo mediante el análisis y comparación de las secuencias del gen 12S ARNr de las especies diana. El estudio del alineamiento permitió elegir zonas internas a las secuencias de ADN delimitadas por los cebadores específicos. La distinta posición de las parejas de cebadores específicos condicionó el diseño de las sondas. De este modo, se diseñaron sondas TaqMan® especie-específicas para la detección de codorniz, faisán, bécada, zorzal común, avestruz, urogallo, paloma bravía, paloma torcaz y paloma zurita, y una sonda para la detección conjunta de las tres especies de paloma analizadas. En cambio, la similitud en la posición de los cebadores específicos de perdiz y pintada, y los cebadores para la detección conjunta de paloma bravía y paloma torcaz, facilitó el diseño de una sonda común para estas especies. Por otra parte, el alineamiento y análisis de las secuencias del gen 18S ARNr de varias especies animales permitió diseñar una sonda TaqMan® conservada en la zona interna de la secuencia de ADN delimitada por los cebadores universales de eucariotas 18SpEu-Dir/18SpEu-Inv.

Para el desarrollo de las técnicas de PCR en tiempo real descritas en esta tesis doctoral, en primer lugar, se evaluó la especificidad de los sistemas de PCR específicos mediante el análisis de ADNs procedentes de diversas especies de aves y

mamíferos tanto de caza como domésticos. En los ensayos de PCR en tiempo real que emplearon el SYBR® Green como molécula fluorescente, la especificidad se comprobó mediante el estudio de las curvas de *melting* o curvas de disociación obtenidas tras el análisis de los ADNs de las distintas especies animales. El análisis de las curvas de disociación se basa en la aplicación de un gradiente de temperaturas creciente después de la PCR para monitorizar la cinética de disociación de los fragmentos amplificados. Mediante esta aplicación se puede determinar la temperatura de *melting* ( $T_m$ ) específica de cada uno de los productos de PCR obtenidos, que se define como la temperatura a la cual el 50 % de las bases nitrogenadas del ADN se encuentran apareadas con las bases de la otra cadena formando parte de la doble hélice, mientras que el otro 50 % de las bases está desapareado. Cada fragmento amplificado tiene una  $T_m$  característica, que depende sobre todo de su longitud y de la composición de sus bases (Costa, 2004). La forma de las curvas de *melting* permite confirmar la identidad de los productos de PCR amplificados, diferenciando los productos de PCR específicos de aquellos productos no específicos que hayan podido generarse, tales como dímeros de cebadores. Los sistemas específicos dieron lugar a los fragmentos esperados a partir del ADN de las correspondientes especies diana con intervalos de  $T_m$  característicos para cada especie animal. En las especies heterólogas analizadas, no se amplificaron fragmentos con  $T_m$  comprendidas en el intervalo de temperaturas característico para cada

especie diana, confirmándose la especificidad de los sistemas. Los valores de  $C_p$  obtenidos en las especies heterólogas fueron superiores al valor de  $C_p$  establecido como negativo para la presencia de ADN diana (valor medio menos dos veces la desviación estándar de los valores de  $C_p$  obtenidos en los controles negativos y las especies no diana). Por otra parte, al utilizar el sistema de control endógeno se amplificó el fragmento esperado de 141 pb en todas las especies analizadas con un intervalo de  $T_m$  comprendido entre 83,12 y 85,68 °C.

Con relación a los ensayos de PCR en tiempo real que emplearon sondas TaqMan® como molécula fluorescente, todos los sistemas específicos permitieron la amplificación del fragmento específico esperado a partir del ADN de las correspondientes especies diana. En el resto de especies analizadas el valor de  $C_p$  obtenido fue siempre de 40, indicando la ausencia de amplificación después de 40 ciclos. Como ya se ha señalado, los métodos que emplean sondas TaqMan® requieren la unión específica de la sonda fluorescente a la secuencia diana delimitada por los cebadores específicos, no siendo necesario llevar a cabo análisis posteriores (curvas de desnaturalización térmica) como ocurre al utilizar la molécula SYBR® Green (Sawyer y col., 2003; Aarts y col., 2006). Por otra parte, con el empleo del sistema de control endógeno (cebadores y sonda de eucariotas del gen 18S ARNr), se amplificó el fragmento esperado de 141 pb en todas las especies analizadas.

Tras determinar la especificidad de

las técnicas, se procedió a evaluar la eficiencia y el límite de detección de las mismas. Para ello se construyeron rectas estándar a partir de mezclas binarias experimentales que contenían distintos porcentajes (0,1, 1, 5, 10, 25 y 50 %) de la especie diana en una matriz cárnica de pollo. Las mezclas binarias se analizaron crudas y tras someterse a un tratamiento térmico de esterilización (121 °C durante 20 min). Los valores de  $C_p$  obtenidos en cada muestra al emplear los correspondientes sistemas de PCR específicos ( $C_p$ CSP), se normalizaron de acuerdo a la siguiente fórmula (Rodríguez y col., 2004, 2005):

$$C_p\text{SPS} = C_p\text{EU} * C_p\text{CSP} / C_p\text{EUS}$$

donde:  $C_p$ SPS es el  $C_p$  normalizado de la muestra analizada con el sistema específico correspondiente,  $C_p$ EUS es el valor de  $C_p$  obtenido para la muestra con el sistema endógeno y  $C_p$ EU es la media de los  $C_p$  obtenidos para cada recta estándar en el sistema endógeno.

La eficiencia de las técnicas de PCR en tiempo real, que indica la capacidad de la reacción de duplicar el número de copias de las cadenas de ADN en cada ciclo, se calculó a partir de las pendientes de las rectas estándar obtenidas al representar los valores de  $C_p$  normalizados frente al logaritmo de las concentraciones de ADN de la especie diana en las mezclas cárnicas de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$E = [10^{(-1/\text{pendiente})} - 1] * 100$$

Las Figuras 1-4, págs. 151-154, muestran las rectas de calibrado obtenidas al analizar las mezclas binarias crudas y

esterilizadas de codorniz, faisán, perdiz, pintada, becada, paloma y zorzal común empleando sondas TaqMan® como sistema de detección. De forma similar, las Figuras 1 y 2, págs. 165, 166 y 174, muestran las rectas estándar obtenidas en el análisis de las mezclas binarias de avestruz y urogallo, respectivamente, mediante el empleo de SYBR® Green y sondas TaqMan®. Por último, en las Figuras 1 y 2, págs. 180 y 181, aparecen las rectas estándar correspondientes al análisis de las mezclas binarias de paloma bravía, paloma torcaz y paloma zurita con sondas TaqMan®. Como puede comprobarse, en todos los sistemas las pendientes de las rectas tuvieron un valor cercano a -3,32, que corresponde a una eficiencia del 100 %.

Asimismo, conviene señalar que las pendientes de las rectas obtenidas al analizar las mezclas binarias crudas y esterilizadas de codorniz, faisán, perdiz, pintada, becada, paloma bravía, paloma torcaz, paloma zurita y zorzal común empleando el reactivo SYBR® Green como sistema de detección, también presentaron valores próximos a -3,32 (resultados no mostrados).

El límite de detección experimental conseguido en todas las mezclas binarias analizadas con los sistemas específicos fue del 0,1 %, tanto en las mezclas crudas como en las esterilizadas. Por otra parte, las ecuaciones de las rectas estándar obtenidas para cada especie diana permitieron calcular el límite de detección teórico de las técnicas. Para los sistemas que emplearon SYBR® Green, este límite se calculó como la

cantidad de ADN obtenida al sustituir en la ecuación de la recta de calibrado el valor de  $C_p$  considerado como negativo para la presencia de ADN diana (valor medio menos dos veces la desviación estándar de los valores de  $C_p$  obtenidos en los controles negativos y las especies no diana). Con relación a las técnicas que utilizaban sondas TaqMan®, el límite de detección teórico se determinó como la cantidad de ADN correspondiente a un  $C_p$  de 40.

Tras comprobar la especificidad y eficiencia de las técnicas de PCR en tiempo real desarrolladas, se evaluó la capacidad de las mismas para cuantificar la presencia de ADN de las especies objeto de estudio. La cuantificación se llevó a cabo mediante el método de la cuantificación absoluta con relación a las rectas de calibrado obtenidas a partir de los valores de  $C_p$  de las mezclas binarias de las especies diana. La concentración de ADN diana en una muestra problema se calcularía interpolando el  $C_p$  normalizado obtenido en la muestra, en la correspondiente recta estándar generada a partir de porcentajes conocidos de la especie diana.

Los datos de fluorescencia obtenidos al final de cada ciclo de amplificación con los sistemas de PCR específicos y con los controles endógenos se analizaron estadísticamente siguiendo la metodología descrita por Camacho y col. (1993) y el protocolo propuesto por *The International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use* (ICH, 2005). El tratamiento estadístico de los datos normalizados de las

correspondientes mezclas binarias crudas y tratadas térmicamente permitió la validación del método de cuantificación a través del análisis de diferentes parámetros como la linealidad, sensibilidad, exactitud y precisión.

Para llevar a cabo la validación de las técnicas en tiempo real desarrolladas en esta tesis doctoral, se realizaron tres extracciones separadas de cada porcentaje de ADN de la especie diana en las mezclas binarias. Las muestras se analizaron en días diferentes, utilizando dos replicados de cada muestra. Los parámetros estadísticos se evaluaron con el programa informático STATGRAPHICS PLUS versión 5.0.

La linealidad del modelo se verificó mediante el análisis de la varianza (ANOVA). En este análisis, el valor “F” representa estadísticamente la regresión, el coeficiente de correlación “r” representa estadísticamente la correlación entre los resultados obtenidos en el test (valores de  $C_p$ ) y la concentración de la especie diana en las mezclas, mientras que el coeficiente de determinación “ $r^2$ ” expresa cuantitativamente esa correlación.

Para estudiar la sensibilidad de las técnicas, se evaluaron los siguientes parámetros:

- el test de *Cochran*, que determina si las varianzas de las respuestas obtenidas para cada concentración de la especie diana en las mezclas son homogéneas, con un nivel de significación de 0,05.
- la sensibilidad de calibrado, que corresponde a la pendiente de la

recta (al ser un modelo lineal).

- la sensibilidad analítica, que es la relación que existe entre la posibilidad de obtener un resultado por azar y que las modificaciones obtenidas sean debidas a las diferencias de concentración de cada mezcla. Se calcula como un cociente entre la sensibilidad de calibrado y la media de las desviaciones estándar (SD, *Standar Deviation*) para todas las concentraciones.
- la capacidad de discriminación, que corresponde a la inversa de la sensibilidad analítica multiplicada por un valor del estadístico t de *Student*. Este parámetro representa la mínima diferencia de concentración de ADN de la especie diana en la mezcla que se puede cuantificar con el método analítico, para un nivel de significación de 0,05.

La sensibilidad analítica y la capacidad de discriminación se calculan a partir de la media de las varianzas de las respuestas “ $S^2_{comb}$ ”.

$$S^2_{comb} = (\sum(\varphi_i * S_i^2)) / (\sum \varphi_i)$$

donde:  $S_i^2$  es la varianza de las respuestas de cada concentración de la mezcla “i” y  $\varphi_i$  son los grados de libertad de esas respuestas.

La exactitud del modelo, que expresa el grado de concordancia entre los resultados obtenidos con el método desarrollado y el valor que se acepta como verdadero o valor de referencia, debe establecerse en un intervalo específico del

procedimiento analítico. Para probar la exactitud de los métodos de PCR en tiempo real, las reacciones de amplificación se llevaron a cabo por duplicado con muestras de ADN de tres porcentajes distintos (25, 10 y 1 %), obtenidos a partir de tres extracciones diferentes en las mezclas binarias crudas y tratadas térmicamente, para cada especie diana. El método se considera exacto cuando, a través de la *t* de *Student*, el valor de la media de recuperación es similar al 100 %.

La precisión o el grado de dispersión de los resultados del análisis en torno a un porcentaje de concentración, indica el error aleatorio del método. Cuando el método se lleva a cabo manteniendo siempre las mismas condiciones, la precisión atribuida al mismo se conoce como repetibilidad. La precisión del ensayo se evaluó comparando los coeficientes de variación (CV) de los valores obtenidos para un mismo porcentaje de concentración en tres días diferentes con los valores obtenidos en el mismo día. Así, se evalúa la influencia de sucesos aleatorios (día del análisis, analista, equipo, reactivos, etc.) en los datos derivados de las mezclas binarias.

Los resultados de linealidad y sensibilidad correspondientes al análisis de las mezclas binarias crudas y esterilizadas de las especies diana empleando sondas TaqMan® como sistema de detección, se muestran en las *Figuras 1-4*, págs. 151-154, para codorniz, faisán, perdiz, pintada, becada, paloma y zorzal común; *Figura 2* pág. 166, para avestruz; y *Figuras 1 y 2*, págs. 180 y 181, para paloma bravía,

paloma torcaz y paloma zurita. Por otra parte, la *Figura 1* pág. 165, muestra los resultados de linealidad y sensibilidad obtenidos al analizar las mezclas binarias de avestruz empleando SYBR® Green. En todos los sistemas, la recta de calibración generada resultó ser lineal en el intervalo de concentraciones analizado. Todos los parámetros estadísticos de linealidad y sensibilidad obtenidos cumplieron con los criterios de aceptación establecidos para la validación del método. Los sistemas desarrollados para la cuantificación de codorniz, faisán, perdiz, pintada, becada, paloma bravía, paloma torcaz, paloma zurita y zorzal común mediante el empleo de SYBR® Green, presentaron también una linealidad y sensibilidad adecuadas (resultados no mostrados).

Asimismo, todas las técnicas desarrolladas demostraron ser exactas independientemente del tipo de molécula fluorescente utilizada como sistema de detección puesto que al realizar el test de la *t* de *Student*, el valor correspondiente a la media de recuperación no difería significativamente del 100 %. Sin embargo, al evaluar la precisión de las técnicas, en todos los casos se observaron diferencias significativas entre los coeficientes de variación de los valores obtenidos al realizar el ensayo en tres días diferentes y los valores obtenidos en el mismo día, obteniéndose coeficientes de variación más elevados en los ensayos realizados en días distintos. Esta variabilidad puede deberse al empleo de diferentes alícuotas de reactivos en los ensayos realizados en diferentes días, así como a variaciones volumétricas mínimas causadas

por errores en el pipeteo durante alguno de los pasos del ensayo de PCR (preparación de alícuotas de ADN, mezcla de reactivos, reparto de los reactivos en los capilares, etc.). Debido a esta limitación, la cuantificación de especies mediante el empleo de los sistemas de PCR en tiempo real desarrollados en este trabajo precisaría de la preparación de rectas de calibrado cada día que se realice el análisis.

Los resultados obtenidos tras llevar a cabo el análisis estadístico de los datos confirmaron que las técnicas de PCR en tiempo real desarrolladas en este trabajo permiten la cuantificación de pequeñas cantidades de ADN de las especies objeto de estudio incluso si las muestras han sido sometidas a tratamientos térmicos muy intensos como la esterilización. No obstante, las ecuaciones de cuantificación de cada especie diana en las correspondientes mezclas cárnicas variaron en función del tipo de tratamiento térmico aplicado a las muestras. En consecuencia, la cuantificación de la especie diana en una muestra problema requeriría de la preparación de diferentes rectas de calibrado con un tratamiento térmico similar al de la muestra analizada.

Por otra parte, el empleo de las sondas TaqMan® en las técnicas de PCR en tiempo real aportó ventajas frente al SYBR® Green, ya que mejoró la especificidad, eficiencia y sensibilidad alcanzadas. Sin embargo, cabe señalar como principal inconveniente el elevado coste que presentan las sondas TaqMan®, así como la dificultad ligada al diseño y disponibilidad de

los oligonucleótidos que componen el sistema TaqMan®-PCR (sondas y cebadores específicos). Por el contrario, el SYBR® Green tiene la ventaja de ser más barato que las sondas específicas TaqMan® y además la optimización de las condiciones de la reacción es muy sencilla. No obstante, el principal inconveniente de este agente intercalante es su baja especificidad, debido a que se une de manera indistinta tanto al producto de PCR esperado como a posibles productos generados inespecíficamente o a dímeros de cebadores. Debido a su inespecificidad, con frecuencia es necesario llevar a cabo procedimientos adicionales como el análisis de las curvas de *melting* o incluso el análisis electroforético de los productos de PCR generados, aumentando el coste del ensayo y el tiempo necesario para confirmar los resultados (Houghton y Cockerill, 2006; Kubista y col., 2006). Para mejorar la especificidad se deben emplear condiciones de reacción óptimas y una selección cuidadosa de los cebadores que disminuyan el riesgo de amplificaciones inespecíficas y la formación de dímeros. Otro inconveniente del empleo del SYBR® Green como marcador es que no es posible detectar simultáneamente varias reacciones de amplificación distintas en el mismo tubo. Recientemente, se han desarrollado nuevos procedimientos basados en la utilización de EvaGreen® como agente intercalador fluorescente (Wu y col., 2008; Chen y col., 2009). En comparación con el SYBR® Green, el EvaGreen® es menos tóxico, por lo que puede ser utilizado en una concentración mayor, presenta una mayor estabilidad y produce menos probabilidades de amplifi-



caciones inespecíficas (Mao y col., 2007).

Una vez demostrada la eficacia de los sistemas de PCR en tiempo real para el análisis cualitativo y cuantitativo de mezclas cárnicas experimentales, se comprobó su aplicabilidad para la detección y cuantificación de las especies diana en diversos productos comerciales (embutidos curados, estofados, patés, conservas escabechadas, hamburguesas, etc.). Para llevar a cabo el análisis de los productos sólo se emplearon los sistemas basados en la utilización de sondas TaqMan<sup>®</sup> puesto que, como ya se ha señalado, la especificidad, eficiencia y sensibilidad de estos sistemas era mayor que la de los sistemas que utilizaban SYBR<sup>®</sup> Green. En la mayoría de los casos, las técnicas de PCR en tiempo real permitieron la detección de las especies diana descritas en el etiquetado de los productos (*Tablas 3 y 4*, págs. 156 y 157; *Tabla 3*, págs. 167 y 168; *Tabla 2*, págs. 182 y 183). No obstante, en varios patés de perdiz y faisán no se detectó la especie diana con los sistemas específicos correspondientes. Sin embargo, estas muestras se amplificaron correctamente con el sistema empleado como control positivo, lo cual podría indicar un fraude en el etiquetado de estos patés. Asimismo, diversas carnes crudas y conservas escabechadas etiquetadas como paloma zurita no se amplificaron con el sistema específico de paloma zurita pero sí se detectó fluorescencia cuando se analizaron con el sistema específico de paloma bravía. Estos resultados podrían indicar un posible fraude derivado de la sustitución de la especie paloma zurita por paloma bravía. Además, se comprobó la

capacidad de los sistemas de PCR en tiempo real para la cuantificación de la especie diana en aquellos productos comerciales que contenían varias especies animales en su composición. El porcentaje de especie diana presente en los productos se calculó interpolando el valor de  $C_p$  normalizado obtenido en cada muestra, en la recta estándar generada a partir de las mezclas experimentales crudas (en el caso de los productos comerciales crudos) o esterilizadas (en los productos comerciales tratados térmicamente) de la especie diana correspondiente. No obstante, en casi todas las muestras analizadas, el porcentaje de especie diana estimado no se correspondía con el contenido real indicado en el etiquetado del producto. En este sentido, como se ha explicado anteriormente, la cuantificación de especies en un producto precisa de la preparación de diferentes rectas de calibrado en función del tratamiento térmico de las muestras y del tipo de tejido analizado. Por tanto, para poder llevar a cabo una cuantificación real del porcentaje de especie diana presente en los productos comerciales sería necesario preparar rectas de calibrado a partir de muestras con composición y tratamiento térmico idénticos a cada producto analizado. Sin embargo, teniendo en cuenta la gran variedad de ingredientes que se utilizan en la preparación de los productos cárnicos (carne, hígado, grasa, leche, huevos, aceite, etc.), así como la diversidad en los tratamientos térmicos aplicados en la industria cárnica, la preparación de diferentes rectas de calibrado para cada tipo de producto resulta inviable. Por esta razón, el empleo de los sistemas de

PCR en tiempo real para el análisis de productos cárnicos queda limitado a una detección cualitativa de la especie diana, no siendo posible la cuantificación real de su contenido. No obstante, aunque sólo puedan ser empleados con fines cualitativos, los resultados obtenidos en este trabajo demuestran que los sistemas de PCR en tiempo real desarrollados constituyen una herramienta muy útil para verificar la autenticidad de productos comerciales de las especies objeto de estudio.

Por otra parte, los productos comerciales que contenían más de una especie animal en su composición se analizaron también mediante PCR convencional empleando cebadores específicos de pollo, pavo, pato, cerdo y vaca diseñados en trabajos previos (Martín y col., 2007a, b, c, 2008) para verificar la composición indicada en el etiquetado. Las especies detectadas mediante este análisis coincidieron con las especies declaradas en el etiquetado, a excepción de varios chorizos y salchichones de avestruz en los que se detectó cerdo a pesar de que en el etiquetado sólo se indicaba la presencia de carne de avestruz y leche de vaca. Estos resultados podrían indicar un posible fraude en el etiquetado de los productos derivado de la adición de carne de cerdo al producto. Asimismo, la presencia de cerdo podría deberse a contaminaciones cruzadas a través de los equipos y utensilios empleados para la elaboración de los productos.

En los últimos años, la detección y cuantificación de productos de PCR mediante la utilización de técnicas de PCR en

tiempo real ha adquirido gran importancia, ya que ha demostrado ser una alternativa relativamente sencilla y eficaz a otras técnicas de análisis más lentas y laboriosas (Ahmed, 2002). Ésta técnica, además de sus numerosas aplicaciones en el campo del diagnóstico clínico y de la investigación básica, ha demostrado su eficacia en el análisis de alimentos, principalmente en la detección y cuantificación de organismos modificados genéticamente (OMG) (Hernández y col., 2004; Toyota y col., 2006; Freese y col., 2007; Chaouachi y col., 2008; Salvi y col., 2008), alérgenos alimentarios frecuentes como frutos secos y cereales (Brezná y Kuchta, 2008; Demmel y col., 2008; Mustorp y col., 2008; Scaravelli y col., 2008; Röder y col., 2011), microorganismos patógenos y alterantes (Chiang y col., 2007; De Martinis y col., 2007; Grady y col., 2008; Krascenicsova y col., 2008; Maede y col., 2008; Malorny y col., 2008; Ridley y col., 2008), así como en el control de la autenticidad y trazabilidad de los alimentos (Brodmann y Moor, 2003; Dooley y col., 2004; Tanabe y col., 2007; Zhang y col., 2007; Kesmen y col., 2009; Köppel y col., 2009). Sin embargo, es importante señalar que, a pesar de la extensa bibliografía existente sobre el empleo de la técnica de PCR en tiempo real para la diferenciación y cuantificación de carnes de especies domésticas en alimentos, su aplicación para la detección cualitativa y cuantitativa de carnes y productos cárnicos de aves de caza y de la avicultura alternativa ha sido, hasta el momento, muy reducida. Chisholm y col. (2008a) desarrollaron una técnica que utilizaba cebadores específicos y sondas

TaqMan® diseñadas en el gen mitocondrial citocromo b para la detección cualitativa de codorniz y faisán. Los resultados obtenidos demostraron la capacidad del ensayo para detectar hasta 10 pg de ADN de faisán y 2 pg de ADN de codorniz en diluciones decimales de ADN extraído a partir de muestras de carne cruda. Asimismo, el empleo de los sistemas específicos diseñados permitió detectar las especies diana en productos comerciales y diversas mezclas cárnicas tratadas a 121 °C y 1,1 bar de presión durante 20 min y 180 °C durante 120 min, que contenían entre un 25 y un 10 % de las especies diana. En cuanto a la detección de ADN de perdiz, pintada, paloma bravía, paloma torcaz, paloma zurita, becada y zorzal común, no existen trabajos previos que aborden la identificación de estas especies mediante técnicas de PCR en tiempo real. Por otra parte, cabe resaltar que, hasta donde llega nuestra información, no existen estudios en los que se lleve a cabo la diferenciación de carnes de paloma bravía, paloma torcaz y paloma zurita mediante técnicas genéticas de PCR.

Con relación a la identificación de avestruz, a parte de la técnica de PCR convencional con cebadores específicos desarrollada por Colombo y col. (2000), se han publicado muy pocos estudios para la detección de ADN de esta especie en carnes y productos cárnicos. Martínez e Yman (1998) desarrollaron una técnica de RADP basada en el empleo de tres cebadores arbitrarios que permitió la diferenciación de carne cruda de avestruz, de carnes procedentes de otras especies como vaca, oveja, cabra, cerdo, búfalo, caballo, burro,

alce, canguro y reno. Por otra parte, Abdulmawjood y Bülte (2002) llevaron a cabo la diferenciación de avestruz, pollo, pavo, pato, cerdo, vaca, oveja y cabra mediante una técnica de PCR-RFLP basada en la digestión de un fragmento conservado de 359 pb del gen citocromo b con cuatro enzimas de restricción. No obstante, como ya se ha mencionado, las técnicas de RAPD y PCR-RFLP presentan limitaciones a la hora de analizar muestras sometidas a tratamientos térmicos intensos y productos cárnicos de composición compleja. En cuanto al empleo de PCR en tiempo real, a parte de las técnicas desarrolladas en esta tesis doctoral, la única técnica de este tipo publicada hasta el momento para la detección de avestruz es la descrita por López-Andreo y col. (2005). El sistema empleado por estos autores se basa en la utilización de una sonda TaqMan® MGB y cebadores específicos diseñados en una región comprendida entre el gen mitocondrial citocromo b y la subunidad 5 de la NADH deshidrogenasa. La técnica de PCR en tiempo real detectó hasta  $3 \times 10^{-5}$  ng de ADN de avestruz en mezclas cárnicas crudas. Sin embargo, no se evaluó su aplicabilidad para la detección de avestruz en muestras sometidas a tratamiento térmico y productos comerciales. Por el contrario, los sistemas de PCR en tiempo real descritos en esta tesis doctoral permitieron llevar a cabo la detección de avestruz en muestras sometidas a tratamientos térmicos intensos así como en una amplia variedad de productos comerciales de diversa composición.

En el caso concreto del urogallo, se han publicado numerosos trabajos basados

en el examen de plumas y heces mediante el empleo de técnicas genéticas como la secuenciación de ADN, el análisis de marcadores microsatélites y la caracterización de SNPs, para estudios de biodiversidad de poblaciones (Regnaut y col., 2006; Duriez y col., 2007; Rodríguez-Muñoz y col., 2007; A'Hara y col., 2009; Jacob y col., 2010). No obstante, hasta donde llega nuestra información, a parte de las técnicas de PCR-RFLP, PCR convencional con cebadores específicos y PCR en tiempo real desarrolladas de esta tesis doctoral, no se han desarrollado técnicas que aborden la diferenciación de carne de urogallo con el fin de controlar su trazabilidad y comercio. El desarrollo de técnicas que permitan la correcta identificación de la carne de esta especie adquiere gran relevancia puesto que, a pesar de que la caza del urogallo está prohibida en diversos países europeos, existen evidencias de su caza furtiva así como del comercio ilícito de su carne. En este sentido, las técnicas de PCR propuestas en esta tesis doctoral constituyen una herramienta de gran utilidad para confirmar la existencia de estas prácticas ilegales, facilitando de este modo la conservación y mantenimiento de la especie. Por otra parte, los métodos desarrollados también permitirían controlar la trazabilidad de la carne y productos cárnicos derivados del urogallo en aquellos países en los que está permitido su comercio.

El empleo de técnicas de PCR en tiempo real para la detección de especies en los alimentos presenta numerosas ventajas frente a otros métodos de análisis como las técnicas de PCR-secuenciación, PCR-RFLP,

o PCR convencional con cebadores específicos. En primer lugar, el tiempo necesario para obtener los resultados se reduce, al no requerir el análisis electroforético posterior de los productos de PCR. Si el equipo empleado es el *LightCycler* o equivalente, esta ventaja es todavía más acusada, pudiéndose completar el proceso de amplificación y detección en 30-40 min. Además, todo el proceso se realiza en el mismo tubo, lo que disminuye el número de manipulaciones y, en consecuencia, la variabilidad de los resultados y las posibilidades de contaminación de las muestras. A diferencia de los sistemas de PCR convencional, en los que los fragmentos amplificados se detectan al final de la PCR, mediante los sistemas de PCR en tiempo real es posible registrar la amplificación en los primeros ciclos de la reacción, lo que asegura que ningún componente pueda estar limitando el proceso de amplificación. Asimismo, las técnicas de PCR en tiempo real presentan una mayor sensibilidad, lo que disminuye el riesgo de falsos negativos. Por otra parte, al poderse analizar un elevado número de muestras simultáneamente, se facilita la automatización y su aplicación en el análisis rutinario de alimentos. Sin embargo, hay que destacar que el empleo de los ensayos de PCR en tiempo real para la cuantificación de especies animales en productos cárnicos presenta limitaciones debido a que la exactitud del método está influenciada por diversos factores que pueden afectar al ADN diana, tales como su degradación y la diferente concentración de este ADN en los distintos tejidos analizados.

Teniendo en cuenta los resultados alcanzados en este trabajo, se puede afirmar que la metodología de PCR en tiempo real propuesta, que emplea cebadores específicos de especie y cebadores conservados de organismos eucariotas, constituye una herramienta rápida, sensible y fiable que tiene un gran interés para verificar la autenticidad de las carnes y productos

cárnicos procedentes de codorniz, faisán, perdiz, pintada, paloma bravía, paloma torcaz, paloma zurita, becada, zorzal común, avestruz y urogallo. Su utilización puede contribuir a garantizar el cumplimiento de las normas de etiquetado y evitar prácticas fraudulentas en la elaboración de estos productos.





# *CAPÍTULO V*

## *Conclusiones*

## *Conclusions*

---





**PRIMERA.** La técnica de PCR-RFLP utilizando las enzimas de restricción seleccionadas en este trabajo y los marcadores genéticos mitocondriales 12S ARN ribosómico y D-loop, ha permitido la obtención de perfiles de restricción especie-específicos para la identificación de carnes procedentes de codorniz, faisán, perdiz roja, perdiz chukar, pintada, paloma torcaz, paloma bravía, becada, zorzal común, urogallo y avestruz, así como su diferenciación de carnes de consumo habitual como el pollo, pavo, pato y oca. La técnica desarrollada en el marcador genético 12S ARN ribosómico sólo resultó adecuada para la identificación de las especies diana en carnes y productos cárnicos crudos. Sin embargo, el empleo del marcador D-loop permitió dicha identificación tanto en carnes y productos cárnicos crudos como tratados térmicamente.

**SEGUNDA.** La técnica de PCR cualitativa con cebadores especie-específicos de codorniz, faisán, perdices del género *Alectoris*, perdiz roja, perdiz pardilla, pintada, paloma, becada, zorzal común, urogallo y avestruz, diseñados en los genes mitocondriales 12S ARN ribosómico y D-loop, ha permitido la identificación específica de carnes y productos cárnicos de las especies mencionadas. En mezclas cárnicas, el límite de detección alcanzado fue del 0,1 % para todas las especies analizadas. La sensibilidad de los ensayos no varió al analizar carnes y productos cárnicos sometidos a distintos tratamientos térmicos.

**TERCERA.** La detección de un polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) en las secuencias obtenidas en un fragmento del intron 1 del gen nuclear que codifica para la rodopsina en perdiz roja, perdiz chukar y perdices híbridas resultantes de cruces entre perdiz roja y perdiz chukar, ha permitido la diferenciación de estas especies en carnes y productos cárnicos crudos y tratados térmicamente.

**CUARTA.** La técnica de PCR en tiempo real con cebadores especie-específicos diseñados en el gen mitocondrial 12S ARN ribosómico, ha permitido la detección y cuantificación de ADN de codorniz, faisán, perdices del género *Alectoris*, pintada, becada, paloma bravía, paloma torcaz, paloma zurita, zorzal común, avestruz y urogallo en mezclas cárnicas experimentales crudas y esterilizadas, en el intervalo comprendido entre el 0,1 % y el 50 %. El tratamiento térmico aplicado a las mezclas y el tipo de tejido analizado influyeron en las ecuaciones de cuantificación obtenidas. La utilización de sondas TaqMan® mejoró los resultados de especificidad, eficiencia y sensibilidad respecto a los obtenidos con el intercalador fluorescente SYBR® Green.

**QUINTA.** La aplicación de la técnica de PCR en tiempo real con sondas TaqMan® al análisis de productos cárnicos comerciales crudos y tratados térmicamente ha permitido la identificación cualitativa de todas las especies seleccionadas en este trabajo.

**FIRST.** The PCR-RFLP technique using the restriction endonucleases selected in this work and the 12S ribosomal RNA and D-loop mitochondrial markers, allowed the unequivocal identification of meats from quail, pheasant, red-legged partridge, chukar partridge, guinea fowl, woodpigeon, common pigeon, Eurasian woodcock, song thrush, capercaillie, and ostrich, and their differentiation from domestic species such as chicken, turkey, duck, and goose. The PCR technique based on the 12S rRNA genetic marker was only appropriate for the identification of the target species in raw meat products. However, the use of the D-loop mitochondrial gene allowed the identification of the target species in both raw and heat-treated meat products.

**SECOND.** The qualitative polymerase chain reaction developed with the specific primers of quail, pheasant, partridge species from the genus *Alectoris*, red-legged partridge, grey partridge, guinea fowl, pigeon, Eurasian woodcock, song thrush, capercaillie, and ostrich, designed in the mitochondrial 12S ribosomal RNA and D-loop genes, allowed the specific identification of meat and meat products from these animal species. In meat mixtures, the detection limit of the PCR assays was set on 0.1 % for all the target species. The sensitivity of the PCR was not modified when heat-treated meat products were analysed.

**THIRD.** The detection of a single nucleotide polymorphism (SNP) in the sequences obtained from a nuclear rhodopsin gene fragment of red-legged partridge, chukar partridge and hybrids resulting from crosses between red-legged partridge and chukar partridge, has allowed the differentiation among these partridge species in raw and heat-treated meat and meat products.

**FOURTH.** The real-time PCR assay based on the use of species-specific primers designed in the mitochondrial 12S ribosomal RNA gene, enabled the identification and quantification of quail, pheasant, partridge species from the genus *Alectoris*, guinea fowl, common pigeon, woodpigeon, stock pigeon, Eurasian woodcock, song thrush, ostrich, and capercaillie, in experimental raw and sterilized meat mixtures in the range of 0.1 % to 50 %. Different calibration curves should be used in accordance with the treatment applied to the samples and the tissue matrix analyzed. TaqMan<sup>®</sup> probes improved the specificity, sensitivity and efficiency of the assay with respect to the fluorescent SYBR<sup>®</sup> Green molecule.

**FIFTH.** The application of the TaqMan<sup>®</sup> real-time PCR assay to the analysis of raw and heat-treated commercial meat products has allowed the qualitative identification of all the species selected in this work.



## *CAPÍTULO VI*

### *Trabajo futuro*

---





## **UTILIZACIÓN DE MICROARRAYS DE ADN Y ESPECTROMETRÍA DE MASA S PARA LA IDENTIFICACIÓN DE AVES DE CAZA Y DE LA AVICULTURA ALTERNATIVA EN CARNES Y PRODUCTOS CÁRNICOS**

Los resultados obtenidos en esta tesis doctoral con las técnicas genéticas desarrolladas (PCR-RFLP, PCR con cebadores especie-específicos y PCR en tiempo real), han permitido la detección del ADN de diferentes especies de aves de caza y de la avicultura alternativa en carnes y productos cárnicos. No obstante, aunque estas técnicas han demostrado ser de gran utilidad para llevar a cabo la identificación de cada una de las especies consideradas, presentan limitaciones para identificar varias especies de manera simultánea. Como ya se ha señalado, la técnica de PCR-RFLP resulta inadecuada para la detección de especies en productos cárnicos constituidos por varias especies animales debido a la dificultad para interpretar adecuadamente los patrones de bandas generados. Con relación a las técnicas de PCR convencional y PCR en tiempo real con cebadores específicos, a pesar de ser muy útiles para la identificación de especies en productos cárnicos complejos, no permiten detectar simultáneamente varias especies diana ya que su empleo requiere llevar a cabo ensayos individuales distintos para cada una de las especies susceptibles de estar presentes en el producto analizado. Este inconveniente podría ser solventado mediante el desarrollo de ensayos de PCR múltiple. Sin embargo, el diseño de ensayos de PCR múltiple presenta dificultades debido a la necesidad de disponer de parejas de cebadores

especie-específicos que no interaccionen entre sí en la misma mezcla reactiva y que tengan temperaturas de melting similares. Además, en la técnica de PCR convencional, los amplicones generados por los cebadores deben ser de tamaño suficientemente diferente como para poder ser separados y diferenciados mediante electroforesis tras la amplificación. No obstante, disponer de dianas de diferentes tamaños resulta complicado si se tiene en cuenta que los cebadores diseñados deben amplificar preferiblemente fragmentos de tamaño inferior a 200 pares de bases para poder ser empleados en el análisis de muestras sometidas a tratamientos térmicos. Por otra parte, los sistemas de PCR múltiple en tiempo real permitirían la detección por separado de las especies diana en un mismo ensayo utilizando sondas de hibridación específicas marcadas con fluoróforos diferentes. Sin embargo, un factor limitante para el desarrollo de técnicas de PCR en tiempo real con formato múltiple es el número de canales de detección que posee el termociclador. En este sentido, los equipos disponibles actualmente en el mercado presentan de cuatro a seis canales de lectura permitiendo sólo la detección, como máximo, de seis especies en un mismo ensayo.

Estas limitaciones plantean la necesidad de desarrollar nuevos métodos que permitan llevar a cabo de forma sencilla y reproducible la detección simultánea de un gran número de especies en un producto cárnico. Teniendo en cuenta estos aspectos, en esta tesis doctoral se propone como trabajo futuro el desarrollo de microarrays de

ADN para la identificación de aves de caza y de la avicultura alternativa en carnes y productos cárnicos.

Por otra parte, como complemento a las técnicas genéticas desarrolladas en esta tesis doctoral, se propone el desarrollo de métodos basados en la detección y caracterización de péptidos especie-específicos mediante espectrometría de masas.

### **Microarrays de ADN**

En los últimos años, las técnicas de biología molecular han experimentado un rápido desarrollo, apareciendo nuevos métodos de análisis masivo que permiten analizar en un solo experimento miles de moléculas. Estos nuevos sistemas de análisis reciben el nombre de microarrays o biochips. Los microarrays (derivados del griego *mikro* (pequeño) y del inglés *array* (distribución ordenada)) son sistemas de análisis multianalítico que consisten en sondas de reconocimiento (proteínas, tejidos, ADN...), unidas a una superficie sólida o matriz. Este sistema se pone en contacto con la muestra problema y permite el análisis simultáneo de miles de moléculas con una sensibilidad muy elevada y gran fiabilidad. Las ventajas de estas técnicas, derivadas de su grado de automatización, miniaturización y alta resolución, así como de su gran versatilidad y precisión, las convierten en herramientas con grandes perspectivas de futuro para la detección e identificación de especies en los alimentos. Teniendo en cuenta estos aspectos, en esta tesis doctoral se propone como trabajo futuro el desarrollo de técnicas de microarrays para la

identificación de especies de aves de caza y de la avicultura alternativa en carnes y productos cárnicos.

El origen de los microarrays se remonta a la miniaturización de las técnicas de afinidad que se han venido empleando desde hace años como instrumentos analíticos en el campo de la biología molecular. Los primeros ensayos de afinidad con muestras inmovilizadas sobre soportes sólidos se realizaron en los años sesenta, en los que bien antígenos o anticuerpos se inmovilizaban sobre una superficie sólida para su detección. El siguiente paso en el desarrollo de estos dispositivos se produjo una década después, cuando Edwin Southern empleó filtros de nitrocelulosa como soporte para la fijación de moléculas de ADN capaces de hibridar con moléculas complementarias en disolución. La detección de estas hibridaciones se realizaba a través de un marcador radiactivo mediante revelado por autorradiografía. Este tipo de técnica, denominada *Southern Blot*, se extendió después al campo de la inmovilización de ARN (*Nothern Blot*) y proteínas (*Western Blot*). La puesta a punto de la técnica de *Southern Blot*, dio lugar a la construcción de matrices de material biológico inmovilizado sobre superficies porosas como las membranas de nitrocelulosa o nylon. Posteriormente se comenzó a trabajar con el empleo de superficies con unos tamaños de poro más reducidos y con soportes sólidos como el vidrio y el silicio. Además, gracias al desarrollo de las técnicas de miniaturización, se disminuyó el tamaño de los puntos de material depositado sobre la superficie. De esta forma se consiguió una mayor densidad

de integración en las matrices de material biológico lo cuál condujo hasta el desarrollo de los microarrays. El primer microarray comercialmente disponible fue producido por la empresa Affymetrix en el año 1994, con una capacidad de 16 000 sondas. Posteriormente al nacimiento de la tecnología desarrollada por Affymetrix se han ido sucediendo la aparición de nuevas compañías y nuevos desarrollos que han permitido alcanzar un alto grado de diversidad tecnológica.

En la actualidad se distinguen diversos tipos de microarrays clasificados en función de criterios diversos como el tipo de material inmovilizado o el material de soporte utilizado. Según el tipo de material inmovilizado, estos dispositivos se clasifican de forma general en:

- Microarrays de ADN. Este tipo de chips tienen inmovilizados en la superficie fragmentos de material genético que pueden ser cadenas de oligonucleótidos cortos (de unas 25 pb aproximadamente) o largos (de entre 50-70 pb), ADNc (ADN complementario sintetizado a partir de ARNm), o bien productos de PCR. Son los más utilizados en el campo de la investigación biotecnológica.
- Microarrays de proteínas (*Protein chips*). Se trata de un soporte sobre el que se fijan distintas proteínas, generalmente anticuerpos. Estos sistemas permiten detectar simultáneamente y de forma eficaz los niveles de proteínas presentes en muestras complejas como suero o

cultivos celulares. Asimismo, permiten la observación global de actividades bioquímicas de miles de proteínas, como las interacciones con otros sustratos (proteínas, ADN y moléculas pequeñas). La fabricación de este tipo de arrays es más compleja y costosa que la de los microarrays de ADN, debido a la dificultad para fabricar e inmovilizar estructuras tridimensionales como son las proteínas, por lo que su uso no está tan extendido.

- Microarrays de tejidos (*Tissue chips* o TMA). Sobre la superficie de estos chips lo que se inmovilizan son pequeñas muestras de tejido para llevar a cabo análisis en paralelo de varias muestras o ensayos múltiples sobre una misma muestra. Proporcionan un nuevo método de alto rendimiento para estudiar el perfil molecular, la expresión del ARNm o el análisis de las alteraciones cromosómicas mediante hibridación *in situ* de múltiples muestras de tejido simultáneamente. Este tipo de arrays está considerado hoy en día una potente herramienta para el análisis masivo del perfil molecular del cáncer. Otras aplicaciones importantes de estos chips son el análisis toxicológico y la búsqueda de agentes patógenos.

Por otra parte, en función del soporte empleado y el tipo de unión, se pueden distinguir tres tipos de chips:

- Chips "*glass-based*". Son chips en

los que el material se encuentra covalentemente inmovilizado a la superficie sólida que le sirve de soporte y que puede ser cristal o cualquier otra superficie como silicio, plástico u oro.

- Chips "*gel-based*". Son chips en los que las interacciones entre el material a inmovilizar y el soporte sólido de inmovilización no tiene carácter covalente. Los soportes más comúnmente empleados son pequeñas porciones de geles, o membranas porosas de nylon o nitrocelulosa presentes sobre portaobjetos de cristal.
- Chips "*electronic-based*". Son chips contruidos sobre electrodos en los que se llevan a cabo las reacciones. A diferencia del resto de arrays, en los que la hibridación es un proceso pasivo y aleatorio, en el caso de los chips microelectrónicos se genera un campo eléctrico que dirige activamente la muestra, incrementando su concentración sobre las sondas, y por tanto, aumentando la efectividad del proceso. Además, este sistema permite hibridaciones seriadas de distintas muestras o bien de una muestra sobre diferentes combinaciones de sondas.

Otros criterios de clasificación de microarrays hacen referencia al diseño del biochip (personalizado o industrial), la forma de fabricación (síntesis *in situ* de las moléculas de interés sobre el propio microarray o síntesis por deposición de

moléculas sintetizadas previamente), o bien a la utilidad perseguida con su utilización (secuenciación, expresión génica, hibridación comparativa, etc.).

Las aplicaciones más conocidas de los microarrays son en el ámbito de la biomedicina, destacando su utilidad en la identificación de dianas terapéuticas (Mousses y col., 2002; Sauter y col., 2003; Wang y col., 2004), desarrollo de fármacos (Scherf y col., 2000; Turton y col., 2001), diagnóstico clínico (Bryant y col., 2004; Doménech-Sánchez y Vila, 2004) y farmacogenómica y farmacogenética (Cigudosa, 2004). En el campo de los alimentos, estas técnicas se han utilizado para la detección de organismos modificados genéticamente (OMGs) en alimentos procesados (Chen y col., 2006; Hamels y col., 2009), la detección de microorganismos patógenos y de residuos de antibióticos en alimentos (Knecht y col., 2004; Peng y Bang-Ce, 2006; Kostrzynska y Bachand, 2007; Kim y col., 2008) así como en la identificación de especies animales y vegetales en alimentos y piensos (Peter y col., 2004; Rønning y col., 2005; Chisholm y col., 2008b; Teletchea y col., 2008; Prins y col., 2010).

En este trabajo se propone el empleo de microarrays de oligonucleótidos cortos (20-25 pb) que es uno de los formatos de microarrays más utilizado para la identificación genética en matrices complejas. Este sistema consta de una colección de oligonucleótidos inmovilizados en un soporte rígido no poroso, destinados a reconocer específicamente determinadas secuencias



de ADN diana previamente amplificadas por PCR a partir de la muestra problema.

La metodología del trabajo a seguir sería la siguiente:

- Seleccionar marcadores genéticos adecuados que sirvan de molde para el diseño de las sondas de reconocimiento en regiones internas a los correspondientes productos amplificados. Se proponen como marcadores los genes mitocondriales 12S ARNr y D-loop. Para facilitar la interpretación de los resultados negativos se utilizarán también controles internos de amplificación (gen 18S ARNr).
- Diseñar y sintetizar sondas de oligonucleótidos. Las sondas cortas (25-35 pb) internas a cada uno de los amplicones seleccionados, deberán diseñarse en zonas que contengan suficientes diferencias en sus secuencias como para permitir la detección específica de las especies diana. Para el diseño de las sondas, se empleará el software *Oligo Desing* (<http://www.enme.umd.edu/bioengineerin/>), ya que este programa automatiza algunas etapas del proceso que mejoran la elección de las sondas.
- Poner a punto las técnicas de microarrays de ADN para la detección específica de las especies seleccionadas en carnes y productos cárnicos. Para ello será necesario:
  - Construir los microarrays de

oligonucleótidos. Cada chip estará formado por las sondas previamente sintetizadas y depositadas en *spot* sobre un soporte de vidrio. En este formato cada *spot* representa un gen y está constituido por un grupo de sondas.

- Preparar y marcar el ADN diana. Empleando el ADN extraído a partir de muestras de carne de las especies objeto de estudio se pondrán a punto las ampli-ficaciones por PCR de los frag-mentos genéticos seleccionados.
- Los amplicones obtenidos se marcarán con un fluorocromo para su posterior incubación sobre el panel de sondas del chip.
- Hibridación de los microarrays y visualización de las reacciones. En la hibridación, el material obtenido de las muestras convenientemente tratado y marcado se pondrá en contacto con el array, produ-ciéndose una reacción de afinidad entre las hebras de ADN de las sondas inmovilizadas en la superficie del chip, con sus cadenas complementarias presen-tes en las muestras a investigar. A continuación, se someterán los arrays a una serie de lavados para eliminar hibridaciones inespecíficas entre la muestra y el material inmovilizado o la superficie del biochip. Posteriormente, se proce-derá a la medición de la señal mediante un escáner.

- Analizar los resultados obtenidos. Tras la detección de la señal, se analizarán las imágenes obtenidas para la obtención de los resultados numéricos utilizando programas informáticos específicos.
- Utilizar los ensayos desarrollados en el análisis de productos cárnicos comerciales a fin de comprobar la aplicabilidad de los microarrays para determinar el origen animal de los productos cárnicos analizados.

### **Espectrometría de masas**

Recientemente, las técnicas de identificación de especies basadas en el análisis de proteínas han experimentado un espectacular desarrollo. Tradicionalmente, las herramientas de las que se disponía para este fin sólo permitían el análisis de proteínas de una forma poco sensible y excesivamente lenta y costosa. Sin embargo, los grandes avances acaecidos en el campo de la espectrometría de masas han propiciado la aparición de nuevos métodos capaces de reconocer y caracterizar de forma rápida, marcadores moleculares proteicos útiles para la identificación de especies en una gran variedad de productos alimenticios.

La espectrometría de masas se basa en el diferente comportamiento que presentan los iones de un compuesto al atravesar campos eléctricos y magnéticos. Dichos iones se separan por su relación masa/carga y posteriormente son detectados y registrados. En principio, el espectro de masas de cada compuesto es único y puede

ser utilizado para caracterizar el analito. Las principales ventajas de esta técnica son: a) proporciona una gran especificidad en la determinación del peso molecular de un compuesto debido a la posibilidad de medir exactamente su masa molecular así como obtener información a partir de los fragmentos iónicos de un analito; b) elevada sensibilidad, pudiendo llegar en ocasiones a detectar señales correspondientes a tan sólo 10 iones; c) es muy versátil, ya que permite determinar la estructura de compuestos muy diversos, siendo aplicable a todo tipo de muestras (volátiles, no volátiles, polares, apolares, sólidos, líquidos y gases); y d) elevada rapidez en la obtención de resultados. Estos factores han contribuido a considerar la espectrometría de masas como una herramienta extraordinariamente prometedora en el control de autenticidad de los alimentos.

Los espectrómetros de masas utilizados en el análisis de proteínas y péptidos pueden ser divididos básicamente en las siguientes partes:

- Sistema de entrada. Su objetivo es introducir una pequeña cantidad de muestra (aproximadamente un micromol) en la fuente de ionización.
- Fuente de ionización. Es el lugar del espectrómetro de masas en el que los componentes de la muestra se convierten en iones. En muchos casos la fuente de ionización y el sistema de entrada están combinados en un único componente. Entre las distintas variantes de estas fuentes de ionización, destacan por

su aplicabilidad a péptidos y proteínas la desorción/ionización mediante láser asistida por matriz (MALDI) y la ionización por electrospray (ESI).

- Analizador. Es la parte del espectrómetro de masas donde tiene lugar la separación de los fragmentos iónicos generados en función de su relación masa/carga. Esta separación se produce por aplicación de diferentes campos eléctricos y magnéticos. Los más utilizados son el analizador de tiempo de vuelo (TOF), el analizador tipo cuadrupolo (Q) y el analizador de trampa de iones (IT).
- Detector. Convierte el haz de iones en una señal eléctrica que puede ser procesada, almacenada y enviada a un ordenador.

El análisis de proteínas mediante espectrometría de masas puede llevarse a cabo según distintos tratamientos. Si se parte de proteínas separadas mediante geles monodimensionales o bidimensionales, se recortan las proteínas del gel donde se han aislado. Si por el contrario se parte de muestras líquidas (fracciones de una cromatografía o un extracto proteico que contenga mezcla de proteínas) es necesario llevar a cabo una limpieza de la muestra, seguida de la desnaturalización, reducción y alquilación de la misma. En ambos casos (proteínas separadas en gel o proteínas en solución), el siguiente paso en el procedimiento consiste en la digestión de las mismas mediante una proteasa específica,

generalmente tripsina porcina, que genera un conjunto de péptidos. Los péptidos son posteriormente analizados por espectrometría de masas siguiendo principalmente dos metodologías:

- Identificación de péptidos mediante “huella peptídica”. Los péptidos resultantes de la digestión de las proteínas, generalmente separadas mediante geles monodimensionales o bidimensionales, se analizan mediante espectrometría de masas tipo MALDI-TOF. En la ionización MALDI los analitos son convertidos en iones mediante la acción de un láser. Esta fuente de ionización se asocia a un analizador de tiempo de vuelo (TOF) en el que los iones se separan en función de su relación masa/carga tras ser acelerados en un campo eléctrico, obteniéndose un espectro de masas del conjunto de péptidos denominado “huella peptídica” (*peptide finger-printing*).
- Identificación de la secuencia de péptidos mediante espectrometría de masas en tándem (MS/MS). En este caso, la mezcla de péptidos obtenidos de la digestión de proteínas, generalmente procedentes de muestras líquidas, se separan por cromatografía líquida y se analizan mediante espectrometría de masas tipo ESI en combinación con un triple cuadrupolo (Q) o una trampa iónica (IT). Estas técnicas permiten el análisis en tiempo real de los péptidos individuales presentes en la

mezcla inicial, dando lugar a la fragmentación de los mismos y la generación de un espectro de masas para cada péptido, también llamado espectro de fragmentación o espectro de masas en tándem (MS/MS). Estos espectros proporcionan información sobre la identidad y posición de los aminoácidos en el péptido. La superposición de los diferentes péptidos, permite obtener la secuencia completa de aminoácidos e identificar la proteína que forman.

Tanto las huellas peptídicas como los espectros MS/MS son característicos de cada una de las proteínas y péptidos, y permiten su identificación. La disponibilidad de ambas técnicas hace de la espectrometría de masas una interesante herramienta para la identificación sistemática de proteínas.

En el análisis de alimentos, la espectrometría de masas se ha empleado con éxito para la determinación de microorganismos patógenos y contaminantes (Andersen y col., 2008; Bianchi y col., 2009; Tormen y col., 2011), la detección de alérgenos (Chassaigne y col., 2007; Monaci y col., 2010; Heick y col., 2011) y la identificación de especies (Carrera y col., 2007; Buckley y col., 2008; Mazzeo y col., 2008; Ortea y col., 2009; Sentandreu y col., 2010).

Teniendo en cuenta estos aspectos, en este trabajo se propone el desarrollo y diseño de nuevos procedimientos para la identificación de aves de caza y de la

avicultura alternativa basados en el análisis de péptidos por espectrometría de masas de tipo MALDI-TOF y espectrometría de masas en tándem (MS/MS).

La metodología del trabajo a seguir sería la siguiente:

- Extraer y purificar las proteínas termoestables de muestras de carne de las especies de aves de caza y de avicultura alternativa objeto de estudio.
- Identificar las proteínas cuyas movilidades electroforéticas, obtenidas por electroforesis monodimensional y bidimensional, sean diferentes para las distintas especies analizadas.
- Digerir las proteínas seleccionadas con tripsina.
- Identificar y caracterizar mediante espectrometría de masas MALDI-TOF, las variaciones en los mapas peptídicos resultantes de las digestiones, con la finalidad de determinar aquellos picos específicos que permitan la diferenciación de las distintas especies.
- Caracterizar los péptidos especie-específicos mediante distintos procedimientos de secuenciación *de novo*, utilizando espectrometría de masas en tándem en un equipo LC-ESI-IT. La determinación de la secuencia de los péptidos específicos, permitirá su identificación como biomarcadores para la identificación inequívoca de las especies

estudiadas.

- Desarrollar un nuevo procedimiento de autenticación para la identificación rápida de las especies de aves de caza y de la avicultura alternativa objeto de estudio a partir de la monitorización mediante

espectrometría de masas, de los distintos péptidos específicos caracterizados en el objetivo anterior.

- Validar el procedimiento de identificación mediante su aplicación a distintos productos comerciales.





# *CAPÍTULO VII*

## *Bibliografía*

---





- AARTS, H.J.M., BOUW, E.M., BUNTJER, J.B., LENSTRA, J.A. y VAN RAAMSDONK, L.W.D. (2006). Detection of bovine meat and bone meal in animal feed at a level of 0.1 %. **Journal of AOAC International** 89, 1443-1446.
- ABAD, J.C., CASTELLÓ, J.A., CARBAJO, E., CASANOVAS, P., DALMAU, A., GARCÍA, E., LERA, R. y MARTÍNEZ-ALESÓN, R. (2003). Reproducción e incubación en avicultura. Real Escuela de Avicultura (Ed.), Barcelona, España.
- ABDEL-RAHMAN, S.M. y AHMED, M.M.M. (2007). Rapid and sensitive identification of buffalo's, cattle's and sheep's milk using species-specific PCR and PCR-RFLP techniques. **Food Control** 18, 1246-1249.
- ABDEL-RAHMAN, S.M., EL-SAADANI, M.A., ASHRY, K.M. y HAGGAG, A.S. (2009). Detection of adulteration and identification of cat's, dog's, donkey's and horse's meat using species-specific PCR and PCR-RFLP techniques. **Australian Journal of Basic and Applied Sciences** 3, 1716-1719.
- ABDULMAWJOOD, A. y BÜLTE, M. (2001). Snail species identification by RFLP-PCR and designing of species-specific oligonucleotide primers. **Journal of Food Science** 66, 1287-1293.
- ABDULMAWJOOD, A. y BÜLTE, M. (2002). Identification of ostrich meat by restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis of cytochrome b gene. **Journal of Food Science** 57, 1688-1691.
- ABE, H. y OKUMA, E. (1995). Discrimination of meat species in processed meat-products based on the ratio of histidine dipeptides. **Journal of the Japanese Society for Food Science and Technology** 42, 827-834.
- A'HARA, S.W., HANCOCK, M., PIERTNEY, S.B. y COTTRELL, J.E. (2009). The Development of a molecular assay to distinguish droppings of black grouse *Tetrao tetrix* from those of capercaillie *Tetrao urogallus* and red grouse *Lagopus Lagopus Scoticus*. **Wildlife Biology** 15, 328-337.
- AHMED, F.E. (2002). Detection of genetically modified organisms in foods. **Trends in Biotechnology** 20, 215-223.
- AIDA, A.A., CHE MAN, Y.B., WONG, C.M.V.L., RAHA, A.R. y SON, R. (2005). Analysis of raw meats and fats of pigs using polymerase chain reaction for Halal authentication. **Meat Science** 69, 47-52.
- AIDOO, K.E. y HAWORTH, R.J.P. (1995). Nutritional and chemical composition of farmed venison. **Journal of Human Nutrition and Dietetics** 8, 441-446.
- ALI, B.A., HUANG, T.H., QIN, D.N. y WANG, X.M. (2004). A review of random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers in fish research. **Reviews in Fish Biology and Fisheries** 14, 443-453.
- ALVES, E., CASTELLANOS, C., OVILO, C., SILIÓ, L. y RODRIGUEZ, C. (2002). Differentiation of the raw material of the Iberian pig meat industry based on the use of amplified fragment length polymorphism. **Meat Science** 67, 157-162.
- ANDERLONI, G. (1998). La cría del avestruz. Mundi-Prensa (Ed.), Madrid, España.
- ANDERSEN, W.C., TURNIPSEED, S.B., KARBIWNYK, C.M., CLARK, S.B., MADSON, M.R., GIESEKER, C.M., MILLER, R.A., RUMMEL, N.G. y REIMSCHUESSEL, R. (2008). Determination and confirmation of melamine residues in catfish, trout, tilapia, salmon, and shrimp by liquid chromatography with tandem mass spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 56, 4340-4347.
- ARRUGA, M.V., GARCIA, C.B. y MONTEAGUDO, L.V. (2007a). DNA analysis-based method for the identification of species of partridge and the detection of hybrids of the genus *Alectoris*. European Patent No. 1,865,069A1.
- ARRUGA, M.V., HADJISTERKOTIS, E., MONTEAGUDO, L.V. y TEJEDOR, M.T. (2007b). A comparative genetic study of two groups of chukar partridges (*Alectoris chukar*) from Cyprus and Argentina, using microsatellite analysis. **European Journal of Wildlife Research** 53, 47-51.
- ARSLAN, A., ILHAK, I., CALICIOGLU, M. y KARAHAN M. (2005). Identification of meats using random amplified polymorphic DNA (RAPD) technique. **Journal of Muscle Foods** 16, 37-45.

- ARSLAN, A., ILHAK, O.I. y CALICIOGLU, M. (2006). Effect of method of cooking on identification of heat processed beef using polymerase chain reaction (PCR) technique. **Meat Science** 72, 326-330.
- ARUN, O.O. y UGUR, M. (2000). Animal species determination in sausages using an SDS-PAGE technique. **Archiv für Lebensmittelhygiene** 51, 49-53.
- ASENSIO, L. (2007). PCR-based methods for fish and fishery products authentication. **Trends in Food Science and Technology** 18, 558-566.
- ASENSIO, L. (2008). Application of multiplex PCR for the identification of grouper meals in the restaurant industry. **Food Control** 19, 1096-1099.
- ASENSIO, L., GONZÁLEZ, I., PAVÓN, M.A., GARCÍA, T. y MARTÍN, R. (2008a). An indirect ELISA and a PCR technique for the detection of grouper (*Epinephelus marginatus*) mislabeling. **Food Additives and Contaminants** 25, 677-683.
- ASENSIO, L., GONZÁLEZ, I., GARCÍA, T. y MARTÍN, R. (2008b). Determination of food authenticity by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Food Control** 19, 1-8.
- ASHOOR, S.H., MONTE, W.C. y STILES, P.G. (1988). Liquid chromatographic identification of meats. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists** 71, 397-403.
- ASTURIAS, L.G. y GARITA, A. (2001). Estudio de factibilidad del establecimiento de una granja para la crianza y venta del avestruz (*Struthio camelus*) en Guatemala. Trabajo de graduación. Universidad EARTH, Guácimo, Costa Rica.
- AYAZ, Y., AYAZ, N.D. y EROL, I. (2006). Detection of species in meat and meat products using enzyme-linked immunosorbent assay. **Journal of Muscle Foods** 17, 214-220.
- BAI, W., XU, W., HUANG, K., YUAN, Y., CAN, S. y LUO, Y. (2009). A novel common primer multiplex PCR (CP-M-PCR) method for the simultaneous detection of meat species. **Food Control** 20, 366-370.
- BALLESTEROS, F. (1998). Las especies de caza en España. Biología, ecología y conservación. Estudio y Gestión del Medio (Ed.), Oviedo, España.
- BARATTI, M., ALBERTI, A., GROENEN, M., VEENENDAAL, T. y DESSI-FULGHERI, F. (2001). Polymorphic microsatellites developed by cross-species amplifications in common pheasant breeds. **Animal Genetics** 32, 222-225.
- BARATTI, M., AMMANNATI, M., MAGNELLI, C. y DESSI-FULGHERI, F. (2005). Introgression of *chukar* genes into a reintroduced red-legged partridge (*Alectoris rufa*) population in central Italy. **Animal Genetics** 36, 29-35.
- BARBANERA, F., NEGRO, J.J., DI GIUSEPPE, G., BERTONCINI, F., CAPPELLI, F. y DINI, F. (2005). Analysis of the genetic structure of red-legged partridge (*Alectoris rufa*, Galliformes) populations by means of mitochondrial DNA and RAPD markers: a study from central Italy. **Biological Conservation** 122, 275-287.
- BARBANERA, F., GUERRINI, M., HADJIGEROU, P., PANAYIDES, P., SOKOS, C., WILKINSON, P., KHAN, A.A., KHAN, B.Y., CAPPELLI, F. y DINI, F. (2007). Genetic insight into Mediterranean *chukar* (*Alectoris chukar*, Galliformes) populations inferred from mitochondrial DNA and RAPD markers. **Genetica** 131, 287-298.
- BARBANERA, F., GUERRINI, M., KHAN, A.A., PANAYIDES, P., HADJIGEROU, P., SOKOS, C., GOMBOBAATAR, S., SAMADI, S., KHAN, B.Y., TOFANELLI, S., PAOLI, G. y DINI, F. (2009). Human-mediated introgression of exotic *chukar* (*Alectoris chukar*, Galliformes) genes from East Asia into native Mediterranean partridges. **Biological Invasions** 11, 333-348.
- BARBANERA, F., PERGAMS, O.R.W., GUERRINI, M., FORCINA, G., PANAYIDES, P. y DINI, F. (2010). Genetic consequences of intensive management in game birds. **Biological Conservation** 143, 1259-1268.
- BARBANERA, F., GUERRINI, M., BERTONCINI, F., CAPPELLI, F., MUZZEDDU, M. y DINI, F. (2011). Sequenced RAPD markers to detect hybridization in the barbary partridge (*Alectoris barbara*, Phasianidae). **Molecular Ecology Resources** 11, 180-184.
- BARILANI, M., DEREGNAUCOURT, S., GALLEGO, S., GALLI, L., MUCCI, N., PIOMBO, R.,

- PUIGCERVER, M., RIMONDI, S., RODRÍGUEZ-TEIJEIRO, J.D., SPANÒ, S. y RANDI, E. (2005). Detecting hybridization in wild (*Coturnix c. coturnix*) and domesticated (*Coturnix c. japonica*) quail populations. **Biological Conservation** 126, 445-455.
- BARILANI, M., BERNARD-LAURENT, A., MUCCI, N., TABARRONI, C., KARK, S., PÉREZ-GARRIDO, J.A. y RANDI, E. (2007). Hybridisation with introduced chukars (*Alectoris chukar*) threatens the gene pool integrity of native rock (*A. graeca*) and red-legged (*A. rufa*) partridge populations. **Biological Conservation** 137, 57-69.
- BEKTAS, I. y BELDUZ, A.O. (2009). PCR based identification and discrimination of *Caranx rhonchus* (Pisces, Carangidae) based on nuclear and mtDNA sequences. **Journal of Animal and Veterinary Advances** 8, 118-125.
- BELLIS, C., ASHTON, K.J., FRENEY, L., BLAIR, B. y GRIFFITHS, L.R. (2003). A molecular genetic approach for forensic animal species identification. **Forensic Science International** 134, 99-108.
- BELLO, N. (2001). Desarrollo de marcadores moleculares en el avestruz. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Barcelona, Barcelona, España.
- BELSHAW, R.H.H. (1985). Guineafowl of the world. Nimrod Book Services (Ed.), Hampshire, Reino Unido.
- BERTOJA, G., GIACCONE, V., CARRARO, L., MININNI, A.N. y CARDAZZO, B. (2009). A rapid and high-throughput real-time PCR assay for species identification: application to stockfish sold in Italy. **European Food Research and Technology** 229, 191-195.
- BIANCHI, F., CARERI, M., MANGIA, A., MATTAROZZI, M., MUSCI, M., CONCINA, I., FALASCONI, M., GOBBI, E., PARDO, M. y SBERVEGLIERI, G. (2009). Differentiation of the volatile profile of microbiologically contaminated canned tomatoes by dynamic headspace extraction followed by gas chromatography-mass spectrometry analysis. **Talanta** 67, 962-970.
- BILLETT, E.E., BEVAN, R., SCANLON, B., PICKERING, K. y GIBBONS, B. (1996). The use of a poultry-specific murine monoclonal antibody directed to the insoluble muscle protein desmin in meat speciation. **Journal of the Science of Food and Agriculture** 70, 396-404.
- BLANCO, J.C. y GONZÁLEZ, J.L. (2006). Libro rojo de los vertebrados de España. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (Ed.), Madrid, España.
- BOTTI, S. y GIUFFRÀ, E. (2010). Oligonucleotide indexing of DNA barcodes: identification of tuna and other scombrid species in food products. **BMC Biotechnology** 10, 60.
- BREZNÁ, B. y KUČHTA, T. (2008). A novel real-time polymerase chain reaction method for the detection of pecan nuts in food. **European Food Research and Technology** 226, 1113-1118.
- BRODMANN, P.D., NICHOLAS, G., SCHALTENBRAND, P. e ILG, E.C. (2001). Identifying unknown game species: experience with nucleotide sequencing of the mitochondrial cytochrome b gene and a subsequent basic local alignment search tool search. **European Food Research and Technology** 212, 491-496.
- BRODMANN, P.D. y MOOR, D. (2003). Sensitive and semi-quantitative TaqMan® real-time polymerase chain reaction systems for the detection of beef (*Bos taurus*) and the detection of the family *Mammalia* in food and feed. **Meat Science** 65, 599-607.
- BRYANT, P.A., VENTER, D., ROBINS-BROWNE, R. y CURTIS, N. (2004). Chips with everything: DNA microarrays in infectious diseases. **Lancet Infectious Diseases** 4, 100-111.
- BUCKLEY, M., COLLINS, M. y THOMAS-OATES, J. (2008). A method of isolating the collagen (I)  $\alpha 2$  chain carboxy telopeptide for species identification in bone fragments. **Analytical Biochemistry** 374, 325-334.
- BUNTJER, J.B., LAMINE, A., HAAGSMA, N. y LENSTRA, J.A. (1999). Species identification by oligonucleotide hybridisation: the influence of processing of meat products. **Journal of the Science of Food and Agriculture** 79, 53-57.
- BUXADÉ, C. (1999). Explotaciones cinegéticas y de

- avestruces. Mundi-Prensa (Ed.), Madrid, España.
- CAMACHO, M.A., TORRES, A.I., GIL-ALEGRE, M.E., OBREGÓN, M.M. y RUIZ, V. (1993). Validation protocol of analytical methods for finished pharmaceutical products. **STP Pharma Pr atiques** 3, 197-202.
- CARBAJO, E., CASTELLÓ, F., CASTELLÓ, J.A., GURRI, L.A., MARÍN, M., MESIÁ, G.J., SALES, J. y SARASQUETA, V.D. (1997). Cría de avestruces, emúes y ñandúes. Real Escuela de Avicultura (Ed.), Barcelona, España.
- CARBAJO, E. (2005). Producción de avestruces. III Symposium Científico Internacional sobre Aves Corredoras, Madrid, España.
- CARBAJO, E. (2006). Producción de avestruces. Situación mundial de la actividad comercial y científica: Madrid 2005. **Eurocarne** 146, 1-13.
- CARRERA, E., GARCÍA, T., CÉSPEDES, A., GONZÁLEZ, I., FERNÁNDEZ, A., ASENSIO, L.M., HERNÁNDEZ, P.E. y MARTÍN, R. (2000). Identification of smoked Atlantic salmon (*Salmo salar*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) using PCR-restriction fragment length polymorphism of the p53 gene. **Journal of AOAC International** 83, 341-346.
- CARRERA, M., CAÑAS, B., PIÑEIRO, C., VÁZQUEZ, J. y GALLARDO, J.M. (2007). De novo mass spectrometry sequencing and characterization of species-specific peptides from nucleoside diphosphate kinase B for the classification of commercial fish species belonging to the family Merlucciidae. **Journal of Proteome Resear ch** 6, 3070-3080.
- CARULLA, D. (2007). Estudio de la dinámica poblacional de la codorniz (*Coturnix coturnix coturnix*) a partir de muestras biológicas capturadas en el valle del Ebro, Menorca, Este y Suroeste de la Península durante la temporada de media veda de 2005. Disponible on line en: <http://www.clubcaza.com/gestion/trabajos/estudioidi namicapoblacionalcodorniz.pdf>.
- CASTELLÓ, J.A. (2005). Producciones alternativas de carne de ave. Jornadas profesionales de avicultura de carne, Valladolid, España.
- CATANESE, G., MANCHADO, M., FERNÁNDEZ-TRUJILLO, A. y INFANTE, C. (2010). A multiplex-PCR assay for the authentication of mackerels of the genus *Scomber* in processed fish products. **Food Chemistry** 122, 319-326.
- CECILIA, J.A. (1991). Especies cinegéticas españolas: descripción, modalidades de caza y trofeos. **Agricultura y Sociedad** 58, 53-79.
- CHAI, K.M., HUAT, L.C., THAI, C.S. y PHANG, S.T.W. (1997). Random amplified polymorphic DNA (RAPD) fingerprint profiling of domestic and game birds. **Asia-Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology** 5, 173-182.
- CHAOUACHI, M., EL MALKI, R., BERARD, A., ROMANIUK, M., LAVAL, V., BRUNEL, D. y BERTHEAU, Y. (2008). Development of a real-time PCR method for the differential detection and quantification of four Solanaceae in GMO analysis: Potato (*Solanum tuberosum*), tomato (*Solanum lycopersicum*), eggplant (*Solanum melongena*) and pepper (*Capsicum annuum*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 56, 1818-1828.
- CHASSAIGNE, H., NORGAARD, J.V. y HENGEL, A.J. (2007). Proteomics-based approach to detect and identify major allergens in processed peanuts by capillary LC-Q-TOF (MS/MS). **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 55, 4461-4473.
- CHE MAN, Y.B., AIDA, A.A., RAHA, A.R. y SON, R. (2007). Identification of pork derivatives in food products by species-specific polymerase chain reaction (PCR) for Halal verification. **Food Control** 18, 885-889.
- CHELOMINA, G.N., ROZHKOVAN, K.V. y IVANOV, S.A. (2008). Discrimination of interspecific hybrids in natural populations of Amur sturgeon fish by means of multilocus RAPD-PCR markers. **Cytology and Genetics** 42, 342-350.
- CHEN, F.C., HSIEH, Y.H.P. y BRIDGMAN, R.C. (2002). Monoclonal antibodies against troponin I for the detection of rendered muscle tissues in animal feedstuffs. **Meat Science** 62, 405-412.
- CHEN, T.L., SANJAYA PRASAD, V., LEE, C.H., LIN, K.H., CHIUEH, L.C. y CHAN, M.T. (2006). Validation of cDNA microarray as a prototype for throughput detection of GMOs. **Botanical Studies**



- 47, 1-11.
- CHEN, Y., WU, Y.J., WANG, J., XU, B.L., ZHONG, Z.Y. y XIA, J.S. (2009). Identification of *Cervidae* DNA in feedstuff using a real-time polymerase chain reaction method with the new fluorescence intercalating dye EvaGreen. **Journal of AOAC International** 92, 175-180.
- CHEN, H.Y., LIU, Y.P. y YAO, Y.G. (2010). Species authentication of commercial beef jerky based on PCR-RFLP analysis of the mitochondrial 12S rRNA gene. **Journal of Genetics and Genomics** 37, 763-769.
- CHIANG, Y.C., FAN, C.M., LIAO, W.W., LIN, C.K. y TSEN, H.Y. (2007). Real-time PCR detection of *Staphylococcus aureus* in milk and meat using new primers designed from the heat shock protein gene htrA sequence. **Journal of Food Protection** 70, 2855-2859.
- CHIKUNI, K., OZUTSUMI, K., KOISHIKAWA, T. y KATO, S. (1990) Species identification of cooked meats by DNA hybridization assay. **Meat Science** 27, 119-128.
- CHIKUNI, K., TABATA, T., SAITO, M. y MONMA, M. (1994). Sequencing of mitochondrial cytochrome b genes for the identification of meat species. **Animal Science and Technology** 65, 571-579.
- CHISHOLM, J., SÁNCHEZ, A., BROWN, J. y HIRD, H. (2008a). The development of species-specific real-time PCR assays for the detection of pheasant and quail in food. **Food Analytical Methods** 1, 190-194.
- CHISHOLM, J., CONYERS, C.M. y HIRD, H. (2008b). Species identification in food products using the bioMérieux Food Expert-ID R system. **European Food Research and Technology** 228, 39-45.
- CHOU, C.C., LIN, S.P., LEE, K.M., HSU, C.T., VICKROY, T.W. y ZEN, J.M. (2007). Fast differentiation of meats from fifteen animal species by liquid chromatography with electrochemical detection using copper nanoparticle plated electrodes. **Journal of Chromatography B** 846, 230-239.
- CIGUDOSA, J.C. (2004). The microarray revolution in biomedical research: types of platforms, uses and perspectives in oncology. **Anales del Sistema Sanitario de Navarra** 27, 11-20.
- COLGAN, S., O'BRIEN, L., MAHER, M., SHILTON, N., McDONNELL, K. y WARD, S. (2001). Development of a DNA-based assay for species identification in meat and bone meal. **Food Research International** 34, 409-414.
- COLOMBO, F., VIACAVA, R. y GIARETTI, M. (2000). Differentiation of the species ostrich (*Struthio camelus*) and emu (*Dromaius novaehollandiae*) by polymerase chain reaction using an ostrich-specific primer pair. **Meat Science** 56, 15-17.
- COLOMBO, F., MARCHISIO, E., PIZZINI, A. y CANTONI, C. (2002). Identification of the goose species (*Anser anser*) in Italian "Mortara" salami by DNA sequencing and a polymerase chain reaction with an original primer pair. **Meat Science** 61, 291-294.
- COLOMBO, F., CARDIA, A., RENON, P. y CANTONI, C. (2004). A note on the identification of *Rupicapra rupicapra* species by polymerase chain reaction product sequencing. **Meat Science** 66, 753-755.
- CONVENIO DE BERNA, de 19 de septiembre de 1979, relativo a la conservación de la vida silvestre y del medio natural de Europa. **Boletín Oficial del Estado** núm. 253, de 1 de octubre de 1986, 33547-33555.
- CORTAY, G., DENUE, J.P., DESCHRYVER, C., DURANTEL, P. y ROSSIGNOL, C. (2003). Enciclopedia de la caza. Tikal (Ed.), Madrid, España.
- COSTA, J. (2004). Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica** 22, 299-305.
- COTA-RIVAS, M. y VALLEJO-CÓRDOBA, B.V. (1997). Capillary electrophoresis for meat species differentiation. **Journal of Capillary Electrophoresis** 4, 195-199.
- COZZI, M.C., STRILLACCI, M.G., VALIATI, P., BIGHIGNOLI, B., CANCEDDA, M. y ZANOTTI, M. (2004). Mitochondrial D-loop sequence variation among Italian horse breeds. **Genetic Selection Evolution** 36, 663-672.
- DALMASSO, A., FONTANELLA, E., PIATTI, P., CIVERA, T., ROSATI, S. y BOTTERO, M.T. (2004).

- A multiplex PCR assay for the identification of animal species in feedstuffs. **Molecular and Cellular Probes** 18, 81-87.
- DALMASSO, A., CIVERA, T., LA NEVE, F. y BOTTERO, M.T. (2010). Simultaneous detection of cow and buffalo milk in mozzarella cheese by real-time PCR assay. **Food Chemistry** 124, 362-366.
- DALTON, D.L y KOTZE, A. (2011). DNA barcoding as a tool for species identification in three forensic wildlife cases in South Africa. **Forensic Science International** 207, 51-54.
- DE, S., BRAHMA, B., POLLEY, S., MUKHERJEE, D., BANERJEE, D., GOHAINA, M., SINGH, K.P., SINGH, R., DATTA, T.K. y GOSWAMI, L. (2011). Simplex and duplex PCR assays for species specific identification of cattle and buffalo milk and cheese. **Food Control** 22, 690-696.
- DE LA FUENTE, M.A. y JUÁREZ, M. (2005). Authenticity assessment of dairy products. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition** 45, 563-585.
- DE MARTINIS, E.C.P., DUVAL, R.E. y HITCHINS, A.D. (2007). Real-time PCR detection of 16S rRNA genes speeds most-probable-number enumeration of foodborne *Listeria monocytogenes*. **Journal of Food Protection** 70, 1650-1655.
- DEL HOYO, J., ELLIOT, A. y SARGATAL, J. (1994). Handbook of the birds of the world, Volume 2: new world vultures to guineafowl. Lynx (Ed.), Barcelona, España.
- DEL HOYO, J., ELLIOT, A. y SARGATAL, J. (1997). Handbook of the birds of the world, Volume 4: sandgrouse to cucos. Lynx (Ed.), Barcelona, España.
- DEMME, A., HUPFER, C., HAMPE, E.I., BUSCH, U. y ENGEL, K.H. (2008). Development of a real-time PCR for the detection of lupine DNA (*Lupinus species*) in foods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 56, 4328-4332.
- DI PINTO, A., FORTE, V.T., CONVERSANO, M.C. y TANTILLO, G.M. (2005). Duplex polymerase chain reaction (D-PCR) for detection of pork meat in horse meat fresh sausages from Italian retail sources. **Food Control** 16, 391-394.
- DING, H.B. y XU, R.J. (1999). Differentiation of beef and kangaroo meat by visible/near-infrared reflectance spectroscopy. **Journal of Food Science** 64, 814-817.
- DIRECTIVA 92/43/CEE del Consejo, de 21 de mayo de 1992, relativa a la conservación de los hábitats naturales y de la fauna y flora silvestres. **Diario Oficial de las Comunidades Europeas** núm. L206, de 22 de julio de 1992, 7-50.
- DIRECTIVA 2009/147/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 30 de noviembre de 2009, relativa a la conservación de las aves silvestres. **Diario Oficial de la Unión Europea** núm. L20, de 26 de enero de 2010, 7-25.
- DOMIFAUNA. (1990). Perdiz. Codorniz. Faisán. Pintada. Colín. De Vecchi S.A. (Ed.), Barcelona, España.
- DOMÉNECH-SÁNCHEZ, A. y VILA, J. (2004). Fundamento, tipos y aplicaciones de los arrays de ADN en la microbiología médica. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica** 22, 46-54.
- DOOLEY, J.J., PAINE, K.E., GARRETT, S.D. y BROWN, H.M. (2004). Detection of meat species using TaqMan real-time PCR assays. **Meat Science** 68, 431-438.
- DOWNEY, G., McELHINNEY, J. y FEARN, T. (2000). Species identification in selected raw homogenized meats by reflectance spectroscopy in the mid-infrared, near-infrared and visible ranges. **Applied Spectroscopy** 54, 894-899.
- DURIEZ, O. (2003). Stratégies individuelles d'hivernage chez la Bécasse des bois (*Scolopax rusticola*): compromis énergétiques pour la sélection de l'habitat. Tesis Doctoral. Universidad de París, París, Francia.
- DURIEZ, O., SACHET, J.M., MENONI, E., PIDANCIER, N., MIQUEL, C. y TABERLET, P. (2007). Phylogeography of the capercaillie in Eurasia: what is the conservation status in the Pyrenees and Cantabrian Mounts? **Conservation Genetics** 8, 513-526.
- EATON, M.J., MEYERS, G.L., KOLOKOTRONIS, S.O., LESLIE, M.S., MARTIN, A.P. y AMATO, G. (2009). Barcoding bushmeat: molecular identification of

- Central African and South American harvested vertebrates. **Conservation Genetics** 11, 1389-1404.
- EBBEHØJ, K.F. y THOMSEN, P.D. (1991). Species differentiation of heated meat products by DNA hybridization. **Meat Science** 30, 221-234.
- ESPIÑOZA, E.O., KIRMS, M.A. y FILIPEK, M.S. (1996). Identification and quantitation of source from haemoglobin of blood and blood mixtures by high performance liquid chromatography. **Journal of Forensic Sciences** 41, 804-811.
- ESPIÑOZA, E.O., LINDLEY, N.C., GORDON, K.M., EKHOFF, J.E. y KIRMS, M.A. (1999). Electrospray ionization mass spectrometric analysis of blood for differentiation of species. **Analytical Biochemistry** 268, 252-261.
- ESPIÑEIRA, M., GONZÁLEZ-LAVIN, N., VIEITES, J.M. y SANTA CLARA, F.J. (2008). Authentication of anglerfish species (*Lophius* spp) by means of polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) and forensically informative nucleotide sequencing (FINS) methodologies. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 56, 10594-10599.
- EUGSTER, A., RUF, J., RENTSCH, J., HUBNER, P. y KOPPEL, R. (2008). Quantification of beef and pork fraction in sausages by real-time PCR analysis: results of an interlaboratory trial. **European Food Research and Technology** 227, 17-20.
- EVANS, J., WICTUM, E.J., PENEDO, M.C.T. y KANTHASWAMY, S. (2007). Real-time polymerase chain reaction quantification of canine DNA. **Journal of Forensic Sciences** 52, 93-96.
- FAESTE, C.K. y PLASSEN, C. (2008). Quantitative sandwich ELISA for the determination of fish in foods. **Journal of Immunological Methods** 329, 45-55.
- FAJARDO, V., GONZÁLEZ, I., LÓPEZ-CALLEJA, I., MARTÍN, I., HERNÁNDEZ, P.E., GARCÍA, T. y MARTÍN, R. (2006). PCR-RFLP authentication of meats from red deer (*Cervus elaphus*), fallow deer (*Dama dama*), roe deer (*Capreolus capreolus*), cattle (*Bos taurus*), sheep (*Ovis aries*), and goat (*Capra hircus*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 54, 1144-1150.
- FAJARDO, V., GONZÁLEZ, I., LÓPEZ-CALLEJA, I., MARTÍN, I., ROJAS, I., PAVÓN, M.A., HERNÁNDEZ, P.E., GARCÍA, T. y MARTÍN, R. (2007a). Analysis of mitochondrial DNA for authentication of meats from chamois (*Rupicapra rupicapra*), pyrenean ibex (*Capra pyrenaica*) and mouflon (*Ovis ammon*) by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism. **Journal of AOAC International** 90, 179-186.
- FAJARDO, V., GONZÁLEZ, I., LÓPEZ-CALLEJA, I., MARTÍN, I., ROJAS, M., HERNÁNDEZ, P.E., GARCÍA, T. y MARTÍN, R. (2007b). Identification of meats from red deer (*Cervus elaphus*), fallow deer (*Dama dama*) and roe deer (*Capreolus capreolus*) using polymerase chain reaction targeting specific sequences from the mitochondrial 12S rRNA gene. **Meat Science** 76, 234-240.
- FAJARDO, V., GONZÁLEZ, I., LÓPEZ-CALLEJA, I., MARTÍN, I., ROJAS, M., HERNÁNDEZ, P.E., GARCÍA, T. y MARTÍN, R. (2007c). PCR identification of meats from chamois (*Rupicapra rupicapra*), pyrenean ibex (*Capra pyrenaica*) and mouflon (*Ovis ammon*) targeting specific sequences from the mitochondrial D-loop. **Meat Science** 76, 644-652.
- FAJARDO, V., GONZÁLEZ, I., MARTÍN, I., ROJAS, M., HERNÁNDEZ, P.E., GARCÍA, T. y MARTÍN, R. (2008). Differentiation of European wild boar (*Sus scrofa scrofa*) and domestic swine (*Sus scrofa domestica*) meats by PCR analysis targeting the mitochondrial D-loop and the nuclear melanocortin receptor 1 (*MC1R*) genes. **Meat Science** 78, 314-322.
- FAJARDO, V., GONZÁLEZ, I., MARTÍN, I., ROJAS, M., HERNÁNDEZ, P.E., GARCÍA, T. y MARTÍN, R. (2009). A LighCycler TaqMan® PCR assay for quantitative detection of chamois (*Rupicapra rupicapra*) and pyrenean ibex (*Capra pyrenaica*) in meat mixtures. **International Journal of Food Science and Technology** 44, 1997-2004.
- FAJEMILEHIM, S.O.K. (2010). Morphostructural characteristics of three varieties of greybreasted helmeted guinea fowl in Nigeria. **International Journal of Morphology** 28, 557-562.

- FELIGINI, M., ALIM, N., BONIZZI, I., ENNE, G. y ALEANDRI, R. (2007). Detection of cow milk in water buffalo cheese by SYBR Green real-time PCR: sensitivity test on governing liquid samples. **Pakistan Journal of Nutrition** 6, 94-98.
- FERRAND, Y., GOSSMANN, F., BASTAT, C. y GUÉNÉZAN, M. (2008). Monitoring of the wintering and breeding woodcock populations in France. **Revista Catalana d'Ornitologia** 24, 44-52.
- FOWLER, A.C., EADIE, J.M. y ENGILIS, A. (2009). Identification of endangered Hawaiian ducks (*Anas wyvilliana*), introduced North American mallards (*A. platyrhynchos*) and their hybrids using multilocus genotypes. **Conservation Genetics** 10, 1747-1758.
- FREESE, L., SCHOLDBERG, T.A., BURTON, D.D., NORDEN, T.D., SHOKERE, L.A. y JENKINS, G.R. (2007). Evaluating homogeneity of LL601 rice in commercial lots using quantitative real-time PCR. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 55, 6060-6066.
- FREZZA, D., FAVARO, M., VACCARI, G., VON-HOLST, C., GIAMBRA, V., ANKLAM, E., BOVE, D., BATTAGLIA, P.A., AGRIMI, U., BRAMBILLA, G., AJMONE-MARSAN, P. y TARTAGLIA, M. (2003). A competitive polymerase chain reaction-based approach for the identification and semiquantification of mitochondrial DNA in differently heat-treated bovine meat and bone meal. **Journal of Food Protection** 66, 103-109.
- FUJIMURA, T., MATSUMOTO, T., TANABE, S. y MORIMATSU, S. (2008). Specific discrimination of chicken DNA from other poultry DNA in processed foods using the polymerase chain reaction. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry** 72, 909-913.
- FUMIÈRE, O., VEYS, P., BOIX, A., VON HOLST, C., BAETEN, V. y BERBEN, G. (2009). Methods of detection, species identification and quantification of processed animal proteins in feedingstuffs. **Biotechnology, Agronomy, Society and Environment** 13, 59-70.
- GARCÍA, C.B. y ARRUGA, M.V. (2006a). Comparative genetic analysis between red-legged partridges (*Alectoris rufa*) and chukar partridges (*A. chukar*): Identification of single-nucleotide polymorphisms. **Animal Research** 55, 335-342.
- GARCÍA, C.B. y ARRUGA, M.V. (2006b). Application of RAPD methodology to preserve the purity of wild red-legged partridges (*Alectoris rufa*, L.). **Wildlife Biology in Practice** 1, 13-16.
- GARRIDO, J.L. (2010). Las tendencias de la caza menor en los últimos treinta años. **Federcaza** 294.
- GHOVVATI, S., NASSIRI, M.R., MIRHOSEINI, S.Z., MOUSSAVI, A.H. y JAVADMANESH, A. (2009). Fraud identification in industrial meat products by multiplex PCR assay. **Food Control** 20, 696-699.
- GIL-AGUSTÍ, M., ESTEVE-ROMERO, J. y CARDABROCH, S. (2008). Anserine and carnosine determination in meat samples by pure micellar liquid chromatography. **Journal of Chromatography A** 1189, 444-450.
- GIRISH, P.S., ANJANEYULU, A.S.R., VISWAS, K.N., ANAND, M., RAJKUMAR, N., SHIVAKUMAR, B.M. y BHASKAR, S. (2004). Sequence analysis of mitochondrial 12S rRNA gene can identify meat species. **Meat Science** 66, 551-556.
- GIRISH, P.S., ANJANEYULU, A.S.R., VISWAS, K.N., SHIVAKUMAR, B.M., ANAND, M., PATEL, M. y SHARMA, B. (2005). Meat species identification by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) of mitochondrial 12S rRNA gene. **Meat Science** 70, 107-112.
- GIRISH, P.S., ANJANEYULU, A.S.R., VISWAS, K.N., SANTHOSH, F.H., BHILEGAONKAR, K.N., AGARWAL, R.K., KONDAIAH, N. y NAGAPPA, K. (2007). Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism of mitochondrial 12S rRNA gene: a simple method for identification of poultry meat species. **Veterinary Research Communications** 31, 447-455.
- GIRISH, P.S., ANJANEYULU, A.S.R., VISWAS, K.N., HAUNSH, S., BHILEGAONKAR, K.N., AGGARWAL, R.K. y KONDAIAH, N. (2009). Poultry meat speciation by sequence analysis of mitochondrial 12S rRNA gene. **Indian Journal of Animal Sciences** 79, 217-220.
- GOLDSTEIN, D.B. y SCHLÖTTERER, C. (1999). Microsatellites: evolution and applications. Oxford

- University Press (Ed.), Nueva York, Estados Unidos.
- GORRACHATEGUI, M. (1996). Alimentación de aves alternativas: codornices, faisanes y perdices. XII Curso de Especialización FEDNA. Fundación Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal (Ed.), Madrid, España.
- GRADY, J.O., SEDANO-BALBAS, S., MAHER, M., SMITH, T. y BARRY, T. (2008). Rapid real-time PCR detection of *Listeria monocytogenes* in enriched food samples based on the *ssrA* gene, a novel diagnostic target. **Food Microbiology** 25, 75-84.
- HA, J.C., JUNG, W.T., NAM, Y.S. y MOON, T.W. (2006). PCR identification of ruminant tissue in raw and heat-treated meat meals. **Journal of Food Protection** 69, 2241-2247.
- HAGEMEIJER, E.J.M. y BLAIR, M.J. (1997). The EBCC atlas of European breeding birds: their distribution and abundance. T. & A.D. Poyser (Ed.), Londres, Reino Unido.
- HAMELS, S., GLOUDEN, T., GILLARD, K., MAZZARA, M., DEBODE, F., FOTI, N., SNEYERS, M., NUEZ, T.E., PLA, M., BERBEN, G., MOENS, W., BERTHEAU, Y., AUDEON, C., VAN DEN EEDE, G. y REMACLE, J. (2009). A PCR-microarray method for the screening of genetically modified organisms. **European Food Research and Technology** 228, 531-541.
- HANSEN-CATTA, P.H. y col. (2003). Larousse de la caza. Spes Editorial S.L. (Ed.), Barcelona, España.
- HAUNSHI, S., BASUMATARY, R., GIRISH, P.S., DOLEY, S., BARDOLOI, R.K. y KUMARD, A. (2009). Identification of chicken, duck, pigeon and pig meat by species-specific markers of mitochondrial origin. **Meat Science** 83, 454-459.
- HEICK, J., FISCHER, M. y PÖPPING, B. (2011). First screening method for the simultaneous detection of seven allergens by liquid chromatography mass spectrometry. **Journal of Chromatography A** 1218, 938-943.
- HERMAN, L. (2001). Determination of the animal origin of raw food by species-specific PCR. **Journal of Dairy Research** 68, 429-436.
- HERNÁNDEZ, M., ESTEVE, T., PRAT, S. y PLA, M. (2004). Development of real-time PCR systems based on SYBR® green I, amplifluor™ and TaqMan® technologies for specific quantitative detection of the transgenic maize event GA21. **Journal of Cereal Science** 39, 99-107.
- HERRERO, B., MADRIÑÁN, M., VIEITES, J.M. y ESPIÑEIRA, M. (2010). Authentication of Atlantic cod (*Gadus morhua*) using real-time PCR. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 58, 4794-4799.
- HIDALGO, S.J. y ROCHA, G. (2001). Distribución y fenología de la becada *Scolopax rusticola* (Linnaeus, 1758) (Charadriiformes, Scolopacidae) durante la invernada en Extremadura. **Zoologica Baetica** 12, 37-48.
- HIRD, H., GOODIER, R. y HILL, M. (2003). Rapid detection of chicken and turkey in heated meat products using the polymerase chain reaction followed by amplicon visualisation with *visitra green*. **Meat Science** 65, 1117-1123.
- HIRD, H., CHISHOLM, J. y BROWN, J. (2005). The detection of commercial duck species in food using a single probe-multiple species-specific primer real-time PCR assay. **European Food Research and Technology** 221, 559-563.
- HIRD, H., CHISHOLM, J., SÁNCHEZ, A., HERNÁNDEZ, M., GOODIER, R., SCHNEEDE, K., BOLTZ, C. y POPPING, B. (2006). Effect of heat and pressure processing on DNA fragmentation and implications for the detection of meat using a real-time polymerase chain reaction. **Food Additives and Contaminants** 23, 645-650.
- HOFFMAN, L.C. y WIKLUND, E. (2006). Game and venison-meat for the modern consumer. **Meat Science** 74, 197-208.
- HOFMANN, K. (1997). Detection of meat of different animal species in meat products. **Fleischwirtschaft** 77, 151-154.
- HOLMES, B.H., STEINKE, D. y WAR, R.D. (2009). Identification of shark and ray fins using DNA barcoding. **Fisheries Research** 95, 280-288.
- HOPWOOD, A.J., FAIRBROTHER, K.S., LOCKLEY, A.K. y BARDSLEY, R.G. (1999). An actin gene-

- related polymerase chain reaction (PCR) test for identification of chicken in meat mixtures. **Meat Science** 53, 227-231.
- HOUGHTON, S.G. y COCKERILL, F.R. (2006). Real-time PCR: overview and applications. **Surgery** 139, 1-5.
- HSIEH, Y.H.P., CHEN, Y.T. y GAJEWSKI, K. (2009). Monoclonal antibody-based sandwich ELISA for reliable identification of imported *Pangasius catfish*. **Journal of Food Science** 74, 602-607.
- HUANG, M.C., HORNG, Y.M., HUANG, H.L., SIN, Y.L. y CHEN, M.J. (2003). RAPD fingerprinting for the species identification of animals. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences** 16, 1406-1410.
- HUANG, Y., LIU, Q., TANG, B., LIN, L., LIU, W., ZHANG, L., LI, N. y HU, X. (2008). A preliminary microsatellite genetic map of the ostrich (*Struthio camelus*). **Cytogenetic and Genome Research** 121, 130-136.
- HUBALKOVA, Z., KRÁLIK, P., KASALOVA, J. y RENCOVA, E. (2008). Identification of gadoid species in fish meat by polymerase chain reaction (PCR) on genomic DNA. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 56, 3454-3459.
- HUNG, C.J., HO, H.P., CHANG, C.C., LEE, M.R., FRANJE, C.A., KUO, S.I., LEE, R.J. y CHOU, C.C. (2011). Electrochemical profiling using copper nanoparticle-plated electrode for identification of ostrich meat and evaluation of meat grades. **Food Chemistry** 126, 1417-1423.
- HUNT, D.J., PARKES, H.C. y LUMLEY, I.D. (1997). Identification of the species of origin of raw and cooked meat products using oligonucleotide probes. **Food Chemistry** 60, 437-442.
- HURLEY, I.P., COLEMAN, R.C., IRELAND, H.E. y WILLIAMS, J.H.H. (2004). Measurement of bovine IgG by indirect competitive ELISA as a means of detecting milk adulteration. **Journal of Dairy Science** 87, 543-549.
- ICH Harmonised Tripartite Guideline. (2005). Validation of analytical procedures: text and methodology Q2 (R1).
- ILHAK, O.I. y ARSLAN, A. (2007a). Identification of poultry meat species by random amplified polymorphic DNA (RAPD) technique. **Firat University Veterinary Journal of Health Sciences** 21, 167-171.
- ILHAK, O.I. y ARSLAN, A. (2007b). Identification of meat species by polymerase chain reaction (PCR) technique. **Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences** 31, 159-163.
- INFANTE, C., CRESPO, D., ZUASTI, E., PONCE, M., PÉREZ, L., FUNES, V., CATANESE, G. y MANCHADO, M. (2006). PCR-based methodology for the authentication of the Atlantic mackerel *Scomber scombrus* in commercial canned products. **Food Research International** 39, 1023-1028.
- INFANTE, C. y MANCHADO, M. (2006). Multiplex-polymerase chain reaction assay for the authentication of the mackerel *Scomber colias* in commercial canned products. **Journal of AOAC International** 89, 708-711.
- JACOB, G., DEBRUNNER, R., GUGERLI, F., SCHMID, B. y BOLLMANN, K. (2010). Field surveys of capercaillie (*Tetrao urogallus*) in the Swiss Alps underestimated local abundance of the species as revealed by genetic analyses of non-invasive samples. **Conservation Genetics** 11, 33-44.
- JONKER, K.M., TILBURG, J.J.H.C., HÄGELE, G.H. y DE BOER, E. (2008). Species identification in meat products using real-time PCR. **Food Additives and Contaminants** 25, 527-533.
- JUG, T., DOVC, P., POHAR, J. y SNOJ, A. (2004). RAPD analysis as a tool for discriminating marble trout from hybrids (marble trout x brown trout) in the zones of hybridization. **Journal of Animal Breeding and Genetics** 121, 156-162.
- KAWKA, M., HORBANCZUK, J.O., SACHARCZUK, M., ZIEBA, G., LUKASZEWICZ, M., JASZCZAK, K. y PARADA, R. (2007). Genetic characteristics of the ostrich population using molecular methods. **Poultry Science** 86, 277-281.
- KAYANG, B.B., INOUE-MURAYAMA, M., HOSHI, T., MATSUO, K., TAKAHASHI, H., MINEZAWA, M., MIZUTANI, M. e ITO, S. (2002). Microsatellite loci in Japanese quail and cross-species amplification in chicken and guinea fowl. **Genetics Selection**

- Evolution** 34, 233-253.
- KAYANG, B.B., YOUSAO, I., INOUE, E., NAAZIE, A., ABE, H., ITO, S. e INOUE-MURAYAMA, M. (2010). Genetic diversity of helmeted guinea fowl (*Numida meleagris*) based on microsatellite analysis. **The Journal of Poultry Science** 47, 120-124.
- KESMEN, Z., SAHIN, F. y YETIM, H. (2007). PCR assay for the identification of animal species in cooked sausages. **Meat Science** 77, 649-653.
- KESMEN, Z., GULLUCE, A., SAHIN, F. y YETIM, H. (2009). Identification of meat species by TaqMan-based real-time PCR assay. **Meat Science** 82, 444-449.
- KIM, J.S., DUNGAN, R. y CROWLEY, D. (2008). Microarray analysis of bacterial diversity and distribution in aggregates from a desert agricultural soil. **Biology and Fertility of Soils** 44, 1003-1011.
- KITANO, T., UMETSU, K., TIAN, W. y OSAWA, M. (2007). Two universal primer sets for species identification among vertebrates. **International Journal of Legal Medicine** 121, 423-427.
- KLINGSPOR, L. y JALAL, S. (2006). Molecular detection and identification of *Candida* and *Aspergillus* spp. from clinical samples using real-time PCR. **Clinical Microbiology and Infection** 12, 745-753.
- KNECHT, B.G., STRASSER, A., DIETRICH, R., MARTLBAUER, E., NIESSNER, R. y WELLER, M.G. (2004) Automated microarray system for the simultaneous detection of antibiotics in milk. **Analytical Chemistry** 76, 646-654.
- KOH, M.C., LIM, C.H., CHUA, S.B., CHEW, S.T. y PHANG, S.T.W. (1998). Random amplified polymorphic DNA (RAPD) fingerprints for identification of red meat animal species. **Meat Science** 48, 275-285.
- KONISHO, K., MINAMI, M., MATSUSHIMA, K. y NEMOTO, K. (2005). Phylogenetic relationship and species identification by RAPD analysis in genus *Capsicum*. **Horticultural Research** 4, 259-264.
- KÖPPEL, R., ZIMMERLI, F. y BREITENMOSER, A. (2009). Heptaplex real-time PCR for the identification and quantification of DNA from beef, pork, chicken, turkey, horse meat, sheep (mutton) and goat. **European Food Research and Technology** 230, 125-133.
- KOSTRZYNSKA, M. y BACHAND, A. (2006). Application of DNA microarray technology for detection, identification, and characterization of food-borne pathogens. **Canadian Journal of Microbiology** 52, 1-8.
- KOTOURA, S., MURAKAMI-YAMAGUCHI, Y., NAKAMURA, M., MIAKE, K., SUGIYAMA, M., TANABE, S. y NARITA, H. (2009). A sandwich ELISA for the determination of beef meat content in processed foods. **Food Science and Technology Research** 15, 613-618.
- KOVEZA, O.V., KOKAEVA, Z.G., KONOVALOV, F.A. y GOSTIMSKY, S.A. (2005). Identification and mapping of polymorphic RAPD markers of pea (*Pisum sativum* L.) genome. **Genetika** 41, 341-348.
- KRASCENICSOVA, K., PIKNOVA, L., KACLIKOVA, E. y KUČHTA, T. (2008). Detection of *Salmonella enterica* in food using two-step enrichment and real-time polymerase chain reaction. **Letters in Applied Microbiology** 46, 483-487.
- KRCMAR, P. y RENCOVA, E. (2005). Quantitative detection of species-specific DNA in feedstuffs and fish meals. **Journal of Food Protection** 68, 1217-1221.
- KUBISTA, M., ANDRADE, J.M., BENGTSSON, M., FOROOTAN, A., JONAS, J., LIND, K., SINDELKA, R., SJÖBACK, R., SJÖGREEN, B., STRÖMBOM, L., STAHLBERG, A. y ZORIC, N. (2006). The real-time polymerase chain reaction. **Molecular Aspects of Medicine** 27, 95-129.
- KULMYRZAEV, A.A., KAROUI, R., DE BAERDEMAEKER, J. y DUFOUR, E. (2007). Infrared and fluorescence spectroscopic techniques for the determination of nutritional constituents in foods. **International Journal of Food Properties** 10, 299-320.
- LA NEVE, F., CIVERA, T., MUCCI, N. y BOTTERO, M.T. (2008). Authentication of meat from game and domestic species by SNaPshot minisequencing analysis. **Meat Science** 80, 216-224.
- LAGO, F.C., HERRERO, B., MADRIÑÁN, M., VIEITES, J.M. y ESPÍÑEIRA, M. (2011). Authentication of



- species in meat products by genetic techniques. **European Food Research and Technology** 232, 509-515.
- LAI, S.J., LIU, Y.P., LIU, Y.X., LI, X.W. y YAO, Y.G. (2006). Genetic diversity and origin Chinese cattle revealed by mtDNA D-loop sequence variation. **Molecular Phylogenetics and Evolution** 38, 146-154.
- LANZILAO, I., BURGALASSI, F., FANCELLI, S., SETTIMELLI, M. y FANI, R. (2005). Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis of mitochondrial cytb gene from species of dairy interest. **Journal of AOAC International** 88, 128-135.
- LAUBE, I., ZAGON, J. y BROLL, H. (2007). Quantitative determination of commercially relevant species in foods by real-time PCR. **International Journal of Food Science and Technology** 42, 336-341.
- LÁZARO, R., SERRANO, M.P. y CAPDEVILA, J. (2005). Nutrición y alimentación de avicultura complementaria: codornices. XXI Curso de Especialización FEDNA. Fundación Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal (Ed.), Madrid, España.
- LEE, J.C.I., TSAI, L.C., HUANG, M.T., JHUANG, J.A., YAO, C.T., CHIN, S.C., WANG, L.C., LINACRE, A. y HSIEH, H.M. (2008). A novel strategy for avian species identification by cytochrome b gene. **Electrophoresis** 29, 2413-2418.
- LENSTRA, J., BUNTJER, J. y JANSSEN, W. (2001). On the origin of meat-DNA techniques for species identification in meat products. **Veterinary Sciences Tomorrow** 2, 1-15.
- LEY 42/2007, de 13 de diciembre de 2007, de la Jefatura del Estado, del Patrimonio Natural y de la Biodiversidad. **Boletín Oficial del Estado** núm. 299, de 14 de diciembre de 2007, 51275-51327.
- LIN, W.F. y HWANG, D.F. (2007). Application of PCR-RFLP analysis on species identification of canned tuna. **Food Control** 18, 1050-1057.
- LOCKLEY, A.K. y BARDSLEY, R.G. (2000). Novel method for the discrimination of tuna (*Thunnus thynnus*) and bonito (*Sarda sarda*) DNA. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 48, 4463-4468.
- LOCKLEY, A.K. y BARDSLEY, R.G. (2002). Intron variability in an actin gene can be used to discriminate between chicken and turkey DNA. **Meat Science** 61, 163-168.
- LÓPEZ-ANDREO, M., LUGO, L., GARRIDO-PERTIERRA, A., PRIETO, M.I. y PUYET, A. (2005). Identification and quantitation of species in complex DNA mixtures by real-time polymerase chain reaction. **Analytical Biochemistry** 339, 73-82.
- LÓPEZ-ANDREO, M., GARRIDO-PERTIERRA, A. y PUYET, A. (2006). Evaluation of post-polymerase chain reaction melting temperature analysis for meat species identification in mixed DNA samples. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 54, 7973-7978.
- LÓPEZ-CALLEJA, I., GONZÁLEZ, I., FAJARDO, V., RODRÍGUEZ, M.A., HERNÁNDEZ, P.E., GARCÍA, T. y MARTÍN R. (2005a). PCR detection of cows' milk in water buffalo milk and mozzarella cheese. **International Dairy Journal** 15, 1122-1129.
- LÓPEZ-CALLEJA, I., GONZÁLEZ, I., FAJARDO, V., MARTÍN, I., HERNÁNDEZ, P.E., GARCÍA, T. y MARTÍN, R. (2005b). Application of polymerase chain reaction to detect adulteration of sheep's milk with goats' milk. **Journal of Dairy Science** 88, 3115-3120.
- LÓPEZ-CALLEJA, I., GONZÁLEZ, I., FAJARDO, V., MARTÍN, I., HERNÁNDEZ, P.E., GARCÍA, T. y MARTÍN, R. (2007). Quantitative detection of goats' milk in sheep's milk by real-time PCR. **Food Control** 18, 1466-1473.
- LOSIO, M.N., FERRANDO, M.L., DAMINELLI, P. y CHEGDANI, F. (2004). Setting up a PCR based method to trace animal species in processed meat products. **Veterinary Research Communications** 28, 253-255.
- LU, X., HOLLOWAY, B., DARE, R.K., KUYPERS, J., YAGI, S., WILLIAMS, J.V., HALL, C.B. y ERDMAN, D.D. (2008). Real-time reverse transcription-PCR assay for comprehensive detection of human rhinoviruses. **Journal of Clinical Microbiology** 46, 533-539.

- LÜHKEN, G., WAGNER, H.W., SEICHTER, D., HECHT, W. y ERHARDT, G. (2009). Genetic characterization of a sheep-dwarf goat hybrid. **Cytogenetic and Genom e Research** 125, 158-161.
- LUND, M. y MADSEN, M. (2006). Strategies for the inclusion of an internal amplification control in conventional and real time PCR detection of *Campylobacter* spp. in chicken fecal samples. **Molecular and Cellular Probes** 20, 92-99.
- LUYKX, D.M.A.M. y VAN RUTH, S.M. (2008). An overview of analytical methods for determining the geographical origin of food products. **Food Chemistry** 107, 897-911.
- MACEDO-SILVA, A., BARBOSA, S.F.C., ALKMIN, M.G.A., VAZ, A.J., SHIMOKOMAKI, M. y TENUTA-FILHO, A. (2000). Hamburger meat identification by dot-ELISA. **Meat Science** 56, 189-192.
- MAEDE, D. (2006). A strategy for molecular species detection in meat and meat products by PCR-RFLP and DNA sequencing using mitochondrial and chromosomal genetic sequences. **European and Food Research Technology** 224, 209-217.
- MAEDE, D., REITING, R., STRAUCH, E., KETTERITZSCH, K. y WICKE, A. (2008). A real-time PCR for detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in food combined with an universal internal amplification control system. **Journal of Consumer Protection and Food Safety** 3, 141-151.
- MAFRA, I., FERREIRA, I.M.P.L.V.O. y OLIVEIRA, M.B.P.P. (2008). Food authentication by PCR-based methods. **European Food Research and Technology** 227, 649-665.
- MALISA, A.L., GWAKISA, P., BALTHAZARY, S., WASSER, S.K. y MUTAYOBA, B.M. (2007). The potential of mitochondrial DNA markers and polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism for domestic and wild species identification. **African Journal of Biotechnology** 5, 1588-1593.
- MALORNY, B., LOFSTROM, C., WAGNER, M., KRAMER, N. y HOORFAR, J. (2008). Enumeration of *Salmonella* bacteria in food and feed samples by real-time PCR for quantitative microbial risk assessment. **Applied and Environmental Microbiology** 74, 1299-1304.
- MANE, B.G., TANWAR, V.K., GIRISH, P.S., SHARMA, D. y DIXIT, V.P. (2008). RAPD markers for differentiation of meat species. **The Indian Journal of Veterinary Research** 17, 9-13.
- MANE, B.G., MENDIRATTA, S.K. y TIWARI, A.K. (2009). Polymerase chain reaction assay for identification of chicken in meat and meat products. **Food Chemistry** 116, 806-810.
- MAO, F., LEUNG, W.Y. y XIN X. (2007). Characterization of EvaGreen and the implication of its physicochemical properties for qPCR applications. **BMC Biotechnology** 7, 76-91.
- MAPA (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación). (2005). Estudio de caracterización de la avicultura de carne alternativa en España. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (Ed.), Madrid, España.
- MARM (Ministerio de Medio Ambiente, y Medio Rural y Marino). (2001-2009). Anuario de Estadística. Ministerio de Medio Ambiente, y Medio Rural y Marino (Ed.), Madrid, España.
- MARM (Ministerio de Medio Ambiente, y Medio Rural y Marino). (2003, 2005). Libro de la alimentación española. Alimentación. Ministerio de Medio Ambiente, y Medio Rural y Marino (Ed.), Madrid, España.
- MARM (Ministerio de Medio Ambiente, y Medio Rural y Marino). (2008). Fichas de consumo. Alimentación. Ministerio de Medio Ambiente, y Medio Rural y Marino (Ed.), Madrid, España.
- MARM (Ministerio de Medio Ambiente, y Medio Rural y Marino). (2011). El sector de la carne de ave en cifras. Principales indicadores económicos en 2010. Ministerio de Medio Ambiente, y Medio Rural y Marino (Ed.), Madrid, España.
- MARTÍ, R. y DEL MORAL, J.C. (2003). Atlas de las aves reproductoras de España. Dirección General de Conservación de la Naturaleza. Sociedad Española de Ornitología (Eds.), Madrid, España.
- MARTÍN, I., GARCÍA, T., FAJARDO, V., LÓPEZ-CALLEJA, I., ROJAS, M., HERNÁNDEZ, P. E. y MARTÍN, R. (2007a). Mitochondrial markers for the

- detection of four duck species and the specific identification of Muscovy duck in meat mixtures using the polymerase chain reaction. **Meat Science** 76, 721-729.
- MARTÍN, I., GARCÍA, T., FAJARDO, V., LÓPEZ-CALLEJA, I., HERNÁNDEZ, P.E., GONZÁLEZ, I. y MARTÍN, R. (2007b). Species-specific PCR for the identification of ruminant species in feedstuffs. **Meat Science** 75, 120-127.
- MARTÍN, I., GARCÍA, T., FAJARDO, V., LÓPEZ-CALLEJA, I., ROJAS, M., PAVÓN, M.A., HERNÁNDEZ, P.E., GONZÁLEZ, I. y MARTÍN, R. (2007c). Detection of chicken, turkey, duck, and goose tissues in feedstuffs, using species-specific polymerase chain reaction. **Journal of Animal Science** 85, 452-458.
- MARTÍN, I., GARCÍA, T., FAJARDO, V., ROJAS, M., PEGELS, N., HERNÁNDEZ, P.E., GONZÁLEZ, I. y MARTÍN, R. (2008). SYBR-Green real-time PCR approach for the detection and quantification of pig DNA in feedstuffs. **Meat Science** 82, 252-259.
- MARTÍNEZ-FRESNO, M., HENRIQUES-GIL, N. y ARANA, P. (2008). Mitochondrial DNA sequence variability in red-legged partridge, *Alectoris rufa*, Spanish populations and the origins of genetic contamination from *A. chukar*. **Conservation Genetics** 9, 1223-1231.
- MARTÍNEZ, I. y DANÍELSDÓTTIR, A.K. (2000). Identification of marine mammal species in food products. **Journal of the Science of Food and Agriculture** 80, 527-533.
- MARTÍNEZ, I. e YMAN, I.M. (1998). Species identification in meat products by RAPD analysis. **Food Research International** 31, 459-466.
- MATAIX, J. (2003). Tabla de composición de alimentos. Universidad de Granada (Ed.), Granada, España.
- MATSUNAGA, T., CHIKUNI, K., TANABE, R., MUROYA, S., NAKAI, H., SHIBATA, K., YAMADA, J. y SHINMURA, Y. (1998). Determination of mitochondrial cytochrome b gene sequence for red deer (*Cervus elaphus*) and the differentiation of closely related deer meats. **Meat Science** 49, 379-385.
- MAUDET, C. y TABERLET, P. (2002). Holstein's milk detection in cheeses inferred from melanocortin receptor 1 (*MC1R*) gene polymorphism. **Journal of Dairy Science** 85, 707-715.
- MAYER, H.K. (2005). Milk species identification in cheese varieties using electrophoretic, chromatographic and PCR techniques. **International Dairy Journal** 15, 595-604.
- MAZZEO, M.F., DE GIULIO, B., GUERRIERO, G., CIARCIA, G., MALORNI, A., RUSSO, G.L. y SICILIANO, R.A. (2008). Fish authentication by MALDI-TOF mass spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 56, 11071-11076.
- MEAD, G.C. (2004). Poultry meat processing and quality. Woodhead Publishing Limited (Ed.), Cambridge, Reino Unido.
- MEYER, A. (1993). Evolution of mitochondrial DNA in fishes. En: Biochemistry and molecular biology of fishes. Hochachka, P.W. y Mommsen, T.P. (Eds.), Amsterdam, Holanda.
- MOATSOU, G. y ANIFANTAKIS, E. (2003). Recent developments in antibody-based analytical methods for the differentiation of milk from different species. **International Journal of Dairy Technology** 56, 133-138.
- MOHINDRA, V., KHARE, P., LAL, K.K., PUNIA, P., SINGH, R.K., BARMAN, A.S. y LAKRA, W.S. (2007). Molecular discrimination of five Mahseer species from Indian peninsula using RAPD analysis. **Acta Zoologica Sinica** 53, 725-732.
- MONACI, L., LOSITO, I., PALMISANO, F. y VISCONTI, A. (2010). Identification of allergenic milk proteins markers in fined white wines by capillary liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A** 1217, 4300-4305.
- MONTIEL-SOSA, J.F., RUIZ-PESINI, E., MONTOYA, J., ROCALÉS, P., LÓPEZ-PÉREZ, M.J. y PÉREZ-MARTOS, A. (2000). Direct and highly species-specific detection of pork meat and fat in meat products by PCR amplification of mitochondrial DNA. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 48, 2829-2832.
- MONTOWSKA, M. y POSPIECH, E. (2007). Species

- identification of meat by electrophoretic methods. **Acta Scientiarum Polo norum, Technologia Alimentaria** 6, 5-16.
- MOREIRAS, O., CARVAJAL, A., CABRERA, L. y CUADRADO, C. (2009). Tablas de composición de alimentos. Pirámide D.L. (Ed.), Madrid, España.
- MOUSSES, S., KALLIONIEMI, A., KAURANIEMI, P., ELKAHLOUN, A. y KALLIONIEMI, O.P. (2002). Clinical and functional target validation using tissue and cell microarrays. **Current Opinion in Chemical Biology** 6, 97-101.
- MURIEL, A. y SERRANO, A. (2009). Estudio productivo de la pintada (*Numida meleagris*) criada en confinamiento. XIII Jornadas sobre Producción Animal. Asociación Interprofesional para el Desarrollo Agrario (Ed.), Zaragoza, España.
- MURUGAIAH, C., NOOR, Z.M., MASTAKIM, M., BILUNG, L.M., SELAMAT, J. y RADU, S. (2009). Meat species identification and Halal authentication analysis using mitochondrial DNA. **Meat Science** 83, 57-61.
- MUSTORP, S., ENGDAHL-AXELSSON, C., SVENSSON, U. y HOLCK, A. (2008). Detection of celery (*Apium graveolens*), mustard (*Sinapis alba*, *Brassica juncea*, *Brassica nigra*) and sesame (*Sesamum indicum*) in food by real-time PCR. **European Food Research and Technology** 226, 771-778.
- NATONEK-WISNIEWSKA, M. y SLOTA, E. (2009). A new method for species identification of poultry based on 12S rRNA fragment polymorphism. **Annals of Animal Science** 9, 127-132.
- NAU, F., DESERT, C., COCHET, M. F., PASCO, M., JAN, S., BARON, F., LAGARRIGUE, S. y GUERIN-DUBIARD, C. (2009). Detection of turkey, duck, and guinea fowl egg in hen egg products by species-specific PCR. **Food Analytical Methods** 2, 231-238.
- NEBOLA, M., BORILOVA, G. y KASALOVA, J. (2010). PCR-RFLP analysis of DNA for the differentiation of fish species in seafood samples. **Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy** 54, 49-53.
- NEGRO, J.J., TORRES, M.J. y GODOY, J.A. (2001). RAPD analysis for detection and eradication of hybrid partridges (*Alectoris rufa* x *A. graeca*) in Spain. **Biological Conservation** 98, 19-24.
- NIJMAN, I.J., HOGENDOORN, M.P., GRUYS, E., LUIKART, G., ERTUGRUL, O., ZAGDSUREN, Y., NGERE, L.O., HASIMA, N., ERHARDT, G., AJMONE-MARSAN, P. y LENTRA, J.A. (2002). Detection of sheep-goat interspecies hybridization by analysis of satellite DNA. **Online Journal of Veterinary Research** 1, 1-6.
- NIJMAN, I.J., OTSEN, M., VERKAAR, E.L., DE RUIJTER, C., HANEKAMP, E., OCHIENG, J.W., SHAMSHAD, S., REGE, J.E., HANOTTE, O., BARWEGEN, M.W., SULAWATI, T. y LENSTRA, J.A. (2003). Hybridization of banteng (*Bos javanicus*) and zebu (*Bos indicus*) revealed by mitochondrial DNA, satellite DNA, AFLP and microsatellites. **Heredity** 90, 10-6.
- NÚÑEZ, N. y DE LA HABA, M.J. (2007). La tecnología NIRS como herramienta de innovación en el control de la calidad de las industrias cárnicas. **Boletín AICE** Diciembre, 33-36.
- ONG, S.B., ZURAINI, M.I., JURIN, W.G., CHEAH, Y.K., TUNUNG, R., CHAI, L.C., HARYANI, Y., GHAZALI, F.M. y SON, R. (2007). Meat molecular detection: sensitivity of polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism in species differentiation of meat from animal origin. **ASEAN Food Journal** 14, 51-59.
- ORTEA, I., CAÑAS, B., CALO-MATA, P., BARROS-VELÁZQUEZ, J. y GALLARDO, J.M. (2009). Arginine kinase peptide mass fingerprinting as a proteomic approach for species identification and taxonomic analysis of commercially relevant shrimp species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 57, 5665-5672.
- PARK, J.K., SHIN, K.H., SHIN, S.C., CHUNG, K.Y. y CHUNG, E.R. (2007). Identification of meat species using species-specific PCR-RFLP fingerprint of mitochondrial 12S rRNA gene. **Korean Journal for Food Science of Animal Resources** 27, 209-215.
- PARSON, W., PEGORARO, K., NIEDERSTÄTTER, H., FÖGER, M. y STEINLECHNER, M. (2000). Species identification by means of the cytochrome b gene. **International Journal of Legal Medicine**

- 121, 423-427.
- PARTIS, L., CROAN, D., GUO, Z., CLARK, R., COLDHAM, T. y MURBY, J. (2000). Evaluation of a DNA fingerprinting method for determining the species origin of meat. **Meat Science** 54, 369-376.
- PASCAL, G. y MAHÉ, S. (2001). Identity, traceability, acceptability and substantial equivalence of food. **Cellular and Molecular Biology** 47, 1329-1342.
- PASCOAL, A., PRADO, M., CASTRO, J., CEPEDA, A. y BARROS-VELÁZQUEZ, J. (2004). Survey of authenticity of meat species in food products subjected to different technological processes, by means of PCR-RFLP analysis. **European Food Research and Technology** 218, 306-312.
- PASCOAL, A., PRADO, M., CALO, P., CEPEDA, A. y BARROS-VELÁZQUEZ, J. (2005). Detection of bovine DNA in raw and heat-processed foodstuffs, commercial foods and specific risk materials by a novel specific polymerase chain reaction method. **European Food Research and Technology** 220, 444-450.
- PASCOAL, A., BARROS-VELÁZQUEZ, J., CEPEDA, A., GALLARDO, J.M., y CALO-MATA, P. (2008). Identification of shrimp species in raw and processed food products by means of a polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism method targeted to cytochrome b mitochondrial sequences. **Electrophoresis** 29, 3220-3228.
- PASCOAL, A., BARROS-VELÁZQUEZ, J., ORTEA, I., CEPEDA, A., GALLARDO, J.M. y CALO-MATA, P. (2011). Molecular identification of the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*), the white leg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) and the Indian white shrimp (*Fenneropenaeus indicus*) by PCR targeted to the 16S rRNA mtDNA. **Food Chemistry** 125, 1457-1461.
- PENG, Z. y BANG-CE, Y. (2006). Development of a high-throughput suspension microarray technology for detection of three kinds of veterinary drug residues: chloramphenicol, clenbuterol and 17-beta-estradiol. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 54, 6978-6983.
- PÉREZ-MARÍN, D., GARRIDO-VARO, A., GUERRERO, J.E., MURRAY, I., PUIGDOMÈNECH, A., DARDENNE, P., BAETEN, V. y ZEGERS, J. (2004). Detection and quantification of mammalian meat and bone meals in compound feedingstuffs by NIR spectroscopy. En: Davies, A.M.C. y Garrido, A. (Eds.), *Near Infrared Spectroscopy: Proceedings of the 11<sup>th</sup> International Conference*. NIR Publications, Chichester, West Sussex, Reino Unido.
- PETER, C., BRÜNNEN-NIEWELER, C., KAMMANN, K., y BÖRCHERS, T. (2004). Differentiation of animal species in food by oligonucleotide microarray hybridization. **European Food Research and Technology** 219, 183-293.
- PFEIFFER, I., BURGER, J. y BRENIG, B. (2004). Diagnostic polymorphisms in the mitochondrial cytochrome b gene allow discrimination between cattle, sheep, goat, roe buck and red deer by PCR-RFLP. **Genetics** 5, 30-34.
- PINHAL, D., GADIG, O.B.F., WASKO, A.P., OLIVEIRA, C., RON, E., FORESTI, F. y MARTINS, C. (2008). Discrimination of shark species by simple PCR of 5S rDNA repeats. **Genetics and Molecular Biology** 31, 361-365.
- PIÑEIRO, C., SOTELO, C.G., MEDINA, I., GALLARDO, J.M. y PÉREZ-MARTÍN, R.I. (1997). Reversed-phase HPLC as a method for the identification of gadoid fish species. **European Food Research and Technology** 204, 411-416.
- POTTS, G.R. (1986). The partridge: pesticides, predation and conservation. Collins (Ed.), Londres, Reino Unido.
- PRADO, M., CALO-MATA, P., VILLA, T.G., CEPEDA, A. y BARROS-VELÁZQUEZ, J. (2007). Co-amplification and sequencing of a cytochrome b fragment affecting the identification of cattle in PCR-RFLP food authentication studies. **Food Chemistry** 105, 436-442.
- PRINS, T.W., VAN DIJK, J.P., VAN HOEF, A.M.A., VOORHUIJZEN, M.M., BROEDERS, S., TRAPMANN, S., SEYFARTH, R., PARDIGOL, A., SCHOEN, C.D., AARTS, H.J.M. y KOK, E.J. (2010). Towards a multiplex cereal traceability tool using padlock probe ligation on genomic DNA. **Food Chemistry** 118, 966-973.
- PUIGCERVER, M., RODRÍGUEZ-TEJEIRO, J.D. y

- GALLEGO, S. (2001). The problem of the subspecies in *Coturnix coturnix* quail. **Game and Wildlife Science** 18, 561-572.
- QUINTEIRO, J., VIDAL, R., IZQUIERDO, M., SOTELO, C.G., CHAPELA, M.J., PÉREZ-MARTÍN, R.I., REBHEIN, H., HOLD, G.L., RUSSELL, V.J., PRYDE, S.E., ROSA, C., SANTOS, A.T. y REY-MÉNDEZ, M. (2001). Identification of hake species (*Merluccius* Genus) using sequencing and PCR-RFLP analysis of mitochondrial DNA control region sequences. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 49, 5108-5114.
- RAHMAN, A.A., DIXIT, V.P. y UMAPATHI, V. (2007). Characterization of thermostable antigens of different species of meat animals. **Indian Journal of Animal Sciences** 77, 840-844.
- RAJAPAKSHA, W.R.A.K.J., THILAKARATNE, I.D.S.I.P., CHANDRASIRI, A.D.N. y NIROSHAN, T.D. (2002). Development of PCR assay for differentiation of some important wild animal meat of Sri Lanka. **Journal of Veterinary Medicine Series B** 49, 322-324.
- RAMADAN, S., ABE, H., HAYANO, A., YAMAURA, J., ONODA, T., MIYAKE, T. e INOUE-MURAYAMA, M. (2011). Analysis of genetic diversity of Egyptian pigeon breeds. **The Journal of Poultry Science** 48, 79-84.
- RAMELLA, M.S., KROTH, M.A., TAGLIARI, C. y ARISI, A.C.M. (2005). Optimization of random amplified polymorphic DNA protocol for molecular identification of *Lophius gastrophysus*. **Ciencia e Tecnología de Alimentos Campinas** 25, 733-735.
- RANTSIOU, K., ALESSANDRIA, V., URSO, R., DOLCI, P. y COCOLIN, L. (2008) Detection, quantification and vitality of *Listeria monocytogenes* in food as determined by quantitative PCR. **International Journal of Food Microbiology** 121, 99-105.
- RAO, Q.C. y HSIEH, Y.H.P. (2008). Competitive enzyme-linked immunosorbent assay for quantitative detection of bovine blood in heat-processed meat and feed. **Journal of Food Protection** 71, 1000-1006.
- RASMUSSEN, R.S., MORRISSEY, M.T. y HANNER, R.H. (2010). A multiplex PCR method for the identification of commercially important salmon and trout species (*Oncorhynchus* and *Salmo*) in North America. **Journal of Food Science** 75, 595-606.
- RASTOGI, G., DHARNE, M.S., WALUJKAR, S., KUMAR, A., PATOLE, M.S. y SHOUCHE, Y.S. (2007). Species identification and authentication of tissues of animal origin using mitochondrial and nuclear markers. **Meat Science** 76, 666-674.
- REAL DECRETO 1095/1989, de 8 de septiembre de 1989, del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, por el que se declaran las especies objeto de caza y pesca y se establecen normas para su protección. **Boletín Oficial del Estado** núm. 218, de 12 de septiembre de 1989, 28819-28821.
- REAL DECRETO 1118/1989, de 15 de septiembre de 1989, del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, por el que se determinan las especies objeto de caza y pesca comercializables y se dictan normas al respecto. **Boletín Oficial del Estado** núm. 224, de 19 de septiembre de 1989, 29453-29454.
- REAL DECRETO 1084/2005, de 16 de septiembre de 2005, del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, de ordenación de la avicultura de carne. **Boletín Oficial del Estado** núm. 233, de 29 de septiembre de 2005, 32148-32154.
- REAL DECRETO 640/2006, de 26 de mayo de 2006, del Ministerio de la Presidencia, por el que se regulan determinadas condiciones de aplicación de las disposiciones comunitarias en materia de higiene, de la producción y comercialización de los productos alimenticios. **Boletín Oficial del Estado** núm. 126, de 27 de mayo de 2006, 19999-20002.
- REAL DECRETO 139/2011, de 4 de febrero de 2011, del Ministerio de Medio Ambiente, y Medio Rural y Marino, para el desarrollo del Listado de Especies Silvestres en Régimen de Protección Especial y del Catálogo Español de Especies Amenazadas. **Boletín Oficial del Estado** núm. 46, de 23 febrero de 2011, 20912-20951.
- REGLAMENTO 1234/2007 del Consejo, de 22 de octubre de 2007, por el que se crea una organización común de mercados agrícolas y se establecen disposiciones específicas para determinados productos agrícolas. **Diario Oficial**

- de la Unión Europea núm. L299, de 16 de noviembre de 2007, 1-149.
- REGLAMENTO 543/2008 de la Comisión, de 16 de junio de 2008, por el que se establecen normas de desarrollo del Reglamento (CE) nº 1234/2007 del Consejo en lo que atañe a la comercialización de carne de aves de corral. **Diario Oficial de la Unión Europea** núm. L157, de 17 de junio de 2008, 46-87.
- REGNAUT, S., LUCAS, F.S. y FUMAGALLI, L. (2006). DNA degradation in avian faecal samples and feasibility of non-invasive genetic studies of threatened capercaillie populations. **Conservation Genetics** 7, 449-453.
- RENCOVA, E., SVODOBA, I. y NECIDOVA, L. (2000). Identification by Elisa of poultry, horse, kangaroo and rat muscle specific proteins in heat-processed products. **Veterinární medicína** 45, 353-356.
- RENON, P., BERNARDI, C., SCOCCA, S., CANTONI, C. y GRIDAVILLA, G. (2003). IEF (Isoelectricfocusing) and gas chromatography to identify wild ruminant species. **Industrie Alimentari** 42, 496-500.
- RENSSEN, G.B., SMITH, W.L., JARAVATA, C.V., OSBURN, B. y CULLOR, J.S. (2006). Development and evaluation of a real-time FRET probe based multiplex PCR assay for the detection of prohibited meat and bone meal in cattle feed and feed ingredients. **Foodborne Pathogens and Disease** 3, 337-346.
- RESOLUCIÓN AAM/1530/2011, de 17 de junio de 2011, del Departamento de Medio Ambiente y Vivienda, por la que se fijan las especies objeto de aprovechamiento cinegético, los periodos hábiles de caza y las vedas especiales para la temporada 2011-2012 en todo el territorio de Cataluña. **Diario Oficial de la Generalitat de Catalunya** núm. 5907, de 27 de junio de 2011, 35536-35541.
- RIDLEY, A.M., ALLEN, V.M., SHARMA, M., HARRIS, J.A. y NEWELL, D.G. (2008). Real-time PCR approach for detection of environmental sources of *Campylobacter* strains colonizing broiler flocks. **Applied and Environmental Microbiology** 74, 2492-2504.
- ROBLES, L., BALLESTEROS, F. y CANUT, J. (2006). El urogallo en España, Andorra y Pirineos franceses. Situación actual (2005). SEO/BirdLife (Ed.), Madrid, España.
- RÖDER, M., VIETHS, S. y HOLZHAUSER, T. (2011). Sensitive and specific detection of potentially allergenic almond (*Prunus dulcis*) in complex food matrices by Taqman® real-time polymerase chain reaction in comparison to commercially available protein-based enzyme-linked immunosorbent assay. **Analytica Chimica Acta** 686, 74-83.
- RODRÍGUEZ, M.A., GARCÍA, T., GONZÁLEZ, I., ASENSIO, L., HERNÁNDEZ, P.E. y MARTÍN, R. (2003a). Identification of goose, mule duck, chicken, turkey, and swine in foie gras by species-specific polymerase chain reaction. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 51, 1524-1529.
- RODRÍGUEZ, M.A., GARCÍA, T., GONZÁLEZ, I., ASENSIO, L., MAYORAL, B., LÓPEZ-CALLEJA, I., HERNÁNDEZ, P.E. y MARTÍN, R. (2003b). Development of a polymerase chain reaction assay for species identification of goose and mule duck in foie gras products. **Meat Science** 65, 1257-1263.
- RODRÍGUEZ, M.A., GARCÍA, T., GONZÁLEZ, I., ASENSIO, L., HERNÁNDEZ, P.E. y MARTÍN, R. (2004). PCR identification of beef, sheep, goat and pork in raw and heat-treated meat mixtures. **Journal of Food Protection** 67, 172-177.
- RODRÍGUEZ, M.A., GARCÍA, T., GONZÁLEZ, I., HERNÁNDEZ, P.E. y MARTÍN, R. (2005). TaqMan® real-time PCR for the detection and quantitation of pork in meat mixtures. **Meat Science** 70, 113-120.
- RODRÍGUEZ-MUÑOZ, R., MIROL, P.M., SEGELBACHER, G., FERNÁNDEZ, A. y TREGENZA, T. (2007). Genetic differentiation of an endangered capercaillie (*Tetrao urogallus*) population at the Southern edge of the species range. **Conservation Genetics** 8, 659-670.
- ROJAS, M., GONZÁLEZ, I., FAJARDO, V., MARTÍN, I., HERNÁNDEZ, P.E., GARCÍA, T. y MARTÍN, R. (2008). Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism authentication of raw meats from game birds. **Journal of AOAC International** 91, 1416-1422.
- ROJAS, M., GONZÁLEZ, I., FAJARDO, V., MARTÍN, I.,



- HERNÁNDEZ, P.E., GARCÍA, T. y MARTÍN, R. (2009). Identification of raw and heat-processed meats from game bird species by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism of the mitochondrial D-loop region. **Poultry Science** 88, 669-679.
- ROJAS, M., GONZÁLEZ, I., PAVÓN, M.A., PEGELS, N., HERNÁNDEZ, P.E., GARCÍA, T. y MARTÍN, R. (2010). Polymerase chain reaction assay for verifying the labelling of meat and commercial meats products from game birds targeting specific sequences from the mitochondrial D-loop region. **Poultry Science** 89, 1021-1032.
- RØNNING, S.B., RUDI, K., BERDAL, K.G. y HOLST-JENSEN, A. (2005). Differentiation of important and closely related cereal plant species (*Poaceae*) in food by hybridisation to an oligonucleotide array. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 53, 8874-8880.
- SÁEZ, R., SANZ, Y. y TOLDRÁ, F. (2004). PCR-based fingerprinting techniques for rapid detection of animal species in meat products. **Meat Science** 66, 659-665.
- SAINA, H. (2005). Guinea fowl (*Numidia meleagris*) production under smallholder farmer management in Guruve district, Zimbabwe. Tesis Doctoral. Universidad de Zimbabwe, Harare, Zimbabwe.
- SAINI, M., DAS, D.K., DHARA, A., SWARUP, D., YADAV, M.P. y GUPTA, P.K. (2007). Characterisation of peacock (*Pavo cristatus*) mitochondrial 12S rRNA sequence and its use in differentiation from closely related poultry species. **British Poultry Science** 48, 162-166.
- SAINSBURY, D. (2002). Salud y manejo de las aves de corral: pollos, pavos, patos, gansos y codornices. Inter-Médica S.A. (Ed.), Buenos aires, Argentina.
- SALEM, G.H.H., FAHMY, A., ELMONEM, H.A., JEHAN, A.G. y MAHMOOD, A.H.. (2009). Application of polymerase chain reaction (PCR) technique for identification of porcine origin in meat, meat by-product and meat bone meal. Proceedings of the 2nd Scientific Conference of Animal Wealth Research in the Middle East and North Africa, El Cairo, Egipto.
- SALVI, S., D'ORSO, F. y MORELLI, G. (2008). Detection and quantification of genetically modified organisms using very short, locked nucleic acid TaqMan probes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 56, 4320-4327.
- SAN MIGUEL, A., SAN MIGUEL, R. y MARTÍN-GIL, F.J. (2010). Importancia de las aplicaciones clínicas de la proteómica. **Revista del Laboratorio Clínico** 3, 40-48.
- SÁNCHEZ, A., QUINTEIRO, J., REY-MÉNDEZ, M., PEREZ-MARTÍN, R.I. y SOTELO, C.G. (2009). Identification of European hake species (*Merluccius merluccius*) using real-time PCR. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 57, 3397-3403.
- SÁNCHEZ, C., ALONSO, M.E., PRIETO, R., GONZÁLEZ, V. y GAUDIOSO, V.R. (2009). Una visión sobre la avicultura para la producción de caza en España. **ITEA** 105, 169-183.
- SANTA CRUZ, A.M., PATIÑO, E.M. y STAMATTI, G.M. (2006). Faisanes en cautiverio. Hemisferio Sur (Ed.), Buenos Aires, Argentina.
- SASAZAKI, S., MUTOH, R.H., TSURIFUNE, K. y MANNEN, H. (2007). Development of DNA markers for discrimination between domestic and imported beef. **Meat Science** 77, 161-166.
- SAUTER, G., SIMON, R. y HILLAN, K. (2003). Tissue microarrays in drug discovery. **Nature Reviews Drug Discovery** 2, 962-972.
- SAVAGE, A.W.J., RICHARDSON, R.I., JOLLEY, P.D., HARGIN, K.D. y STEWART, C.A. (1995). Investigation of methods to detect mechanically recovered meat in meat products - II: Gel Electrophoresis. **Meat Science** 40, 303-317.
- SAWYER, J., WOOD, C., SHANAHAN, D., GOUT, S. y McDOWELL, D. (2003). Real-time PCR for quantitative meat species testing. **Food Control** 14, 579-583.
- SCANDURA, M., IACOLINA, L., APOLLONIO, M., DESSI-FULGHERI, F. y BARATTI, M. (2010). Current status of the Sardinian partridge (*Alectoris barbara*) assessed by molecular markers. **European Journal of Wildlife Research** 56, 33-42.
- SCARAVELLI, E., BROHÉE, M., MARCHELLI, R. y

- VAN HENGEL, A.J. (2008). Development of three real-time PCR assays to detect peanut allergen residue in processed food products. **Euro pean Food Research and Technology** 227, 857-869.
- SCHERF, B.D. (2000). World watch list for domestic animal diversity. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) (Ed.), Roma, Italia.
- SCHERF, U., ROSS, D.T., WALTHAM, M., SMITH, L.H., LEE, J.K., TANABE, L., KOHN, K.W., REINHOLD, W.C., MYERS, T.G., ANDREWS, D.T., SCUDIERO, D.A., EISEN, M.B., SAUSVILLE, E.A., POMMIER, Y., BOTSTEIN, D., BROWN, P.O. y WEINSTEIN, J.N. (2000). A gene expression database for the molecular pharmacology of cancer. **Nature Genetics** 24, 234-244.
- SCHÖENBRUCHER, H., ABDULMAWJOOD, A., GÖBEL, K.A. y BÜLTE, M. (2007). Detection of central nervous system tissues in meat products: Validation and standardization of a real-time PCR-based detection system. **Veterinary Microbiology** 123, 336-345.
- SENTANDREU, M.A., FRASER, P.D., HALKET, J., PATEL, R. y BRAMLEY, P.M. (2010). A proteomic based approach for detection of chicken in meat mixes. **Journal of Prote ome Research** 9, 3374-3383.
- SEVILLA, R.G., DIEZ, A., NORÉN, M., MOUCHEL, O., JÉRÔME, M., VERREZ-BAGNIS, V., VAN PELT, H., FAVRE-KREY, L., KREY, G. y BAUTISTA, J.M. (2007). Primers and polymerase chain reaction conditions for DNA barcoding teleost fish based on the mitochondrial cytochrome b and nuclear rhodopsin genes. **Molecular Ecology Not es** 7, 730-734.
- SEZAKI, K., ITOI, S. y WATABE, S. (2005). A simple method to distinguish two commercially valuable eel species in Japan *Anguilla japonica* and *A-anguilla* using polymerase chain reaction strategy with a species-specific primer. **Fisheries Science** 71, 414-421.
- SHENDURE, J.A., PORRECA, G.J. y CHURCH, J.M. (2008). Overview of DNA sequencing strategies. **Current Proto cols in Mole cular Biolo gy** 81, 7.1.1-7.1.11.
- SHIN, S.C., CHUNG, K.Y. y CHUNG, E.R. (2006). Identification of meat species using PCR-RFLP marker of cytochrome b gene. **Korean Journal of Food Scienc e and Animal Resourc es** 26, 375-379.
- SHINODA, N., HASHIMOTO, Y., TAKAGI, M., KOJIMA, F., ONODERA, T. y SUGIURA, K. (2011). PCR-RFLP identification of prohibited animal derived DNA in animal feed. **Food Hygiene and Safety Science** 52, 24-27.
- SIMMONS, R.E., LAVRETSKY, P. y MAY, B. (2009). Introgressive hybridization of redband trout in the upper McCloud river watershed. **Transactions of the American Fisheries Society** 139, 201-213.
- SMITH, P.J., McVEAGH, S.M. y STEINKE, D. (2008). DNA barcoding for the identification of smoked fish products. **Journal of Fish Biology** 72, 464-471.
- SNOW, D.W. y PERRINS, C.M. (1998). The birds of the Western Palearctic. Oxford University Press (Ed.), Oxford, Reino Unido.
- SOARES, S., AMARAL, J.S., MAFRA, I. y OLIVEIRA, M.B.P.P. (2010). Quantitative detection of poultry meat adulteration with pork by a duplex PCR assay. **Meat Science** 85, 531-536.
- SONG, H., XUE, H. y HAN, Y. (2011). Detection of cow's milk in Shaanxi goat's milk with an ELISA assay. **Food Control** 22, 883-887.
- STAMOULIS, P., STAMATIS, C., SARAFIDOU, T. y MAMURIS, Z. (2010). Development and application of molecular markers for poultry meat identification in food chain. **Food Co ntrol** 21, 1061-1065.
- STIRTZEL, S., ANDREE, S., SEUSS-BAUM, I. y SCHWAGELE, F. (2007). Authentication of the most common poultry species by means of PCR. **Fleischwirtschaft** 87, 86-89.
- SUEKAWA, Y., AIHARA, H., ARAKI, M., HOSOKAWA, D., MANNEN, H. y SASAZAKI, S. (2010). Development of breed identification markers based on a bovine 50K SNP array. **Meat Science** 85, 285-288.
- SUN, Y.L. y LIN, C.S. (2003). Establishment and application of a fluorescent polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism

- (PCR-RFLP) method for identifying porcine, caprine and bovine meats. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 51, 1771-1776.
- TANABE, S., HASE, M., YANO, T., SATO, M., FUJIMURA, T. y AKIYAMA, H. (2007). A real-time quantitative PCR detection method for pork, chicken, beef, mutton and horseflesh in foods. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry** 71, 3131-3135.
- TANG, B., HUANG, Y.H., LIN, L., HU, X.X., FENG, J.D., YAO, P., ZHANG, L. y LI, N. (2003). Isolation and characterization of 70 novel microsatellite markers from ostrich (*Struthio camelus*) genome. **Genome** 46, 833-840.
- TEJEDOR, M.T., MONTEAGUDO, L.V., HADJISTERKOTIS, E. y ARRUGA, M.V. (2005). Genetic variability and population structure in Cypriot chukar partridges (*Alectoris chukar cypriones*) as determined by microsatellite analysis. **European Journal of Wildlife Research** 51, 232-236.
- TEJEDOR, M.T., MONTEAGUDO, L.V. y ARRUGA, M.V. (2006). DNA single strand conformation polymorphisms (SSCP's) studies on spanish red-legged partridges. **Wildlife Biology in Practice** 2, 8-12.
- TEJEDOR, M.T., MONTEAGUDO, L.V., MAUTNER, S., HADJISTERKOTIS, E. y ARRUGA, M.V. (2007). Introgression of *Alectoris chukar* genes into a Spanish wild *Alectoris rufa* population. **Journal of Heredity** 98, 179-182.
- TEJERINA, D., LÓPEZ-PARRA, M.M. y GARCÍA-TORRES, S. (2009). Potential use of near infrared reflectance spectroscopy to predict meat physico-chemical composition of guinea fowl (*Numida meleagris*) reared under different production systems. **Food Chemistry** 113, 1290-1296.
- TELETCHÉA, F., MAUDET, C. y HÄNNI, C. (2005). Food and forensic molecular identification: update and challenges. **Trends in Biotechnology** 23, 359-366.
- TELETCHÉA, F., BERNILLON, J., DUFFRAISSE, M., LAUDET, V. y HÄNNI, C. (2008). Molecular identification of vertebrate species by oligonucleotide microarray in food and forensic samples. **Journal of Applied Ecology** 45, 967-975.
- TERMES, S., TAULER, R. y PUIGDOMÈNECH, A. (2004). Preliminary results in the determination of meat and bone meal in feedingstuffs. En: Davies, A.M.C. y Garrido, A. (Eds.), *Near Infrared Spectroscopy: Proceedings of the 11<sup>th</sup> International Conference*. NIR Publications, Chichester, West Sussex, Reino Unido.
- TINGEY, A. (2003). DNA and food analysis. **New Food** 6, 77-82.
- TOBE, S.S. y LINACRE, A.M.T. (2008). A multiplex assay to identify 18 European mammal species from mixtures using the mitochondrial cytochrome b gene. **Electrophoresis** 29, 340-347.
- TOOROP, R.M., MURCH, S.J. y BALL, R.O. (1997). Development of a rapid and accurate method for separation and quantification of myofibrillar proteins in meat. **Food Research International** 30, 619-627.
- TORMEN, L., TORRES, D.P., DITTERT, I.M., ARAÚJO, R.G.O., FRESCURA, V.L.A. y CURTIUS, A.J. (2011). Rapid assessment of metal contamination in commercial fruit juices by inductively coupled mass spectrometry after a simple dilution. **Journal of Food Composition and Analysis** 24, 95-102.
- TOYOTA, A., AKIYAMA, H., SUGIMURA, M., WATANABE, T., SAKATA, K., SHIRAMASA, Y., KITTA, K., HINO, A., ESAKA, M. y MAITANI, T. (2006). Rapid quantification methods for genetically modified maize contents using genomic DNAs pretreated by sonication and restriction endonuclease digestion for a capillary-type real-time PCR system with a plasmid reference standard. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry** 70, 2965-2973.
- TRAXLER, B., BREM, G., MÜLLER, M. y ACHMANN, R. (2000). Polymorphic DNA microsatellites in the domestic pigeon, *Columba livia* var. *domestica*. **Molecular Ecology** 9, 366-368.
- TURTON, N.J., JUDAH, D.J., RILEY, J., DAVIES, R., LIPSON, D., STYLES, J.A., SMITH, A.G. y GANT, T.W. (2001). Gene expression and amplification in breast carcinoma cells with intrinsic and acquired doxorubicin resistance. **Oncogene** 20, 1300-1306.

- UNSELD, M., BEYERMANN, B., BRANDT, P. y HIESEL, R. (1995). Identification of the species origin of highly processed meat products by mitochondrial DNA sequences. **PCR Methods and Applications** 4, 241-243.
- VALLEJO, B., GONZÁLEZ, A.F., MAZORRA, M.A. y RODRÍGUEZ, R. (2005). Capillary electrophoresis for the analysis of meat authenticity. **Journal of Separation Science** 28, 826-836.
- VALLEJO-CÓRDOBA, B., RODRÍGUEZ-RAMÍREZ, R. y GONZÁLEZ-CÓRDOVA, A.F. (2010). Capillary electrophoresis for bovine and ostrich meat characterisation. **Food Chemistry** 120, 304-307.
- VERKAAR, E.L.C., NIJMAN, I.J., BOUTAGA, K. y LENSTRA, J.A. (2002). Differentiation of cattle species in beef by PCR-RFLP of mitochondrial and satellite DNA. **Meat Science** 60, 365-369.
- VILJOEN, M., HOFFMAN, L.C. y BRAND, T.S. (2005). Prediction of the chemical composition of freeze dried ostrich meat with near infrared reflectance spectroscopy. **Meat Science** 69, 255-261.
- VILLANÚA, D. (2007). Parásitos de la perdiz roja: implicaciones para su aprovechamiento cinegético y conservación. Tesis Doctoral. Instituto de Investigación en Recursos Cinegéticos (IREC-CSIC-UCLM-JCCM), Universidad de Castilla-La Mancha, Ciudad Real, España.
- VOELKERDING, K.V., DAMES, S.A. y DURTSCHI, J.D. (2009). Next-generation sequencing: from basic research to diagnostics. **Clinical Chemistry** 55, 641-658.
- WALKER, J.A., HUGHES, D.A., ANDERS, B.A., SHEWALE, J., SINHA, S.K. y BATZER, M.A. (2003). Quantitative intra-short interspersed element PCR for species-specific DNA identification. **Analytical Biochemistry** 316, 259-269.
- WALKER, J.A., HUGHES, D.A., HEDGES, D.J., ANDERS, B.A., LABORDE, M.E., SHEWALE, J., SINHA, S.K. y BATZER, M.A. (2004). Quantitative PCR for DNA identification based on genome-specific interspersed repetitive elements. **Genomics** 83, 518-527.
- WANG, S., SIM, T.B., KIM, Y.S. y CHANG, Y.T. (2004). Tools for target identification and validation. **Current Opinion in Chemical Biology** 8, 371-377.
- WANG, Q., ZHANG, X., ZHANG, H.Y., ZHANG, J., CHEN, G.Q., ZHAO, D.H., MA, H.P. y LIAO, W.J. (2010). Identification of 12 animal species meat by T-RFLP on the 12S rRNA gene. **Meat Science** 85, 265-269.
- WARD, R.D., ZEMLAK, T.S., INNES, B.H., LAST, P.R. y HEBERT, P.D.N. (2005). DNA barcoding Australia's fish species. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London** 360, 1847-1857.
- WEDER, J.K.P. (2002). Identification of food and feed legumes by RAPD-PCR. **Lebensmittel Wissenschaft und Technologie** 35, 504-511.
- WILLIAMS, C.L., BRUST, R.C., FENDLEY, T.T., TILLER, G.R. y RHODES, O.E. (2005). A comparison of hybridization between mottled ducks (*Anas fulvigula*) and mallards (*A. platyrhynchos*) in Florida and South Carolina using microsatellite DNA analysis. **Conservation Genetics** 6, 445-453.
- WILSON, I.G. (1997). Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. **Applied and Environmental Microbiology** 63, 3741-3751.
- WOLF, C., RENTSCH, J. y HÜBNER, P. (1999). PCR-RFLP analysis of mitochondrial DNA: a reliable method for species identification. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 47, 1350-1355.
- WONG, H.K. y HANNER, R.H. (2008). DNA barcoding detects market substitution in North American seafood. **Food Research International** 41, 828-837.
- WU, W., CHEN, Y., GE, Y., WANG, J., XU, B., HUANG, W. y YUAN, F. (2008). Detection of olive oil using the Evagreen real-time PCR method. **European Food Research and Technology** 227, 1117-1124.
- XIA, J., YU, Z. y KONG, X. (2009). Identification of seven *Crassostrea* oysters from the South China Sea using PCR-RFLP analysis. **Journal of Molluscan Studies** 75, 139-146.
- YAN, P., WU, X.B., SHI, Y., GU, C.M., WANG, R.P. y WANG, C.L. (2005). Identification of Chinese alligators (*Alligator sinensis*) meat by diagnostic PCR of the mitochondrial cytochrome *b* gene.

- Biological Conservation** 121, 45-51.
- YANG, Z., HAN, L., LIU, X. y LI, Q. (2008). Detecting and quantifying meat meal or meat and bone meal contamination in fishmeal by visible and near infrared reflectance spectra. **Animal Feed Science and Technology** 147, 357-367.
- YIN, R.H., BAI, W.L., WANG, J.M., WU, C.D., DOU, Q.L., YIN, R.L., HE, J.B. y LUO, G.B. (2009). Development of an assay for rapid identification of meat from yak and cattle using polymerase chain reaction technique. **Meat Science** 83, 38-44.
- ZANE, L., BARGELLONI, L. y PATARNELLO, T. (2002). Strategies for microsatellite isolation: a review. **Molecular Ecology** 11, 1-16.
- ZHA, D., XING, X. y YANG, F. (2010). A multiplex PCR assay for fraud identification of deer products. **Food Control** 21, 1402-1407.
- ZHANG, C.L., FOWLER, M.R., SCOTT, N.W., LAWSON, G. y SLATER, A. (2007). A TaqMan real-time PCR system for the identification and quantification of bovine DNA in meats, milks, and cheeses. **Food Control** 18, 1149-1158.
- ZHANG, J., HUANG, H., CAI, Z. y HUANG, L. (2007). Species identification in salted products of red snappers by semi-nested PCR-RFLP based on the mitochondrial 12S rRNA gene sequence. **Food Control** 18, 1331-1336.
- ZHANG, J. (2011). Species Identification of marine fishes in China with DNA barcoding. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine** 2011, ID 978253.
- ZOMBORSZKY, Z., SZENTMIHÁLY, G., SARUDI, I., HORN, P. y SZABÓ, C.S. (1996). Nutrient composition of muscles in deer and boar. **Journal of Food Science** 61, 625-627.



## *CAPÍTULO VIII*

### *Glosario de Abreviaturas*

---







<b>ADN</b>	Ácido Desoxirribonucleico				Coeficiente de Variación
<b>ADNc</b>	Ácido Desoxirribonucleico Complementario	<b>DNA</b>	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>		
<b>AFLP</b>	<i>Amplified Fragment Length Polymorphism</i> Polimorfismo en la Longitud de Fragmentos Amplificados	<b>dNTP</b>	<i>Deoxyribonucleotide triphosphate</i> Desoxirribonucleótidos trifosfato		
<b>ANOVA</b>	<i>Analysis of Variance</i> Análisis de la Varianza	<b>DOCE</b>	Diario Oficial de las Comunidades Europeas		
<b>APCI</b>	<i>Atmospheric Pressure Chemical Ionization</i> Ionización Química a Presión Atmosférica	<b>DOGC</b>	Diario Oficial de la Generalitat de Catalunya		
<b>ARN</b>	Ácido Ribonucleico	<b>DOUE</b>	Diario Oficial de la Unión Europea		
<b>ARNm</b>	Ácido Ribonucleico Mensajero	<b>E</b>	<i>Efficiency</i> Eficiencia		
<b>ARNr</b>	Ácido Ribonucleico Ribosómico	<b>EC</b>	<i>European Commission</i>		
<b>ASICCAZA</b>	Asociación Interprofesional de la Carne de Caza	<b>EDTA</b>	<i>Ethylenediaminetetraacetic Acid</i> Ácido Etilendiaminotetraacético		
<b>bar</b>	Bar	<b>EI</b>	<i>Electron Impact</i> Ionización Electrónica		
<b>BLAST</b>	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>	<b>ELISA</b>	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>		
<b>BOE</b>	Boletín Oficial del Estado	<b>EMBL</b>	<i>European Molecular Biology Laboratory</i>		
<b>BSA</b>	<i>Bovine Serum Albumin</i> Seroalbúmina Bovina	<b>EMBOSS</b>	<i>European Molecular Biology Open Software Suite</i>		
<b>BSE</b>	<i>Bovine Spongiform Encephalopathy</i> Encefalopatía Espongiforme Bovina	<b>ESI</b>	<i>Electrospray ionization</i> Ionización por Electrospray		
<b>bp</b>	base pair	<b>EU</b>	<i>European Union</i> Unión Europea		
<b>CE</b>	Comunidad Europea	<b>FAB</b>	<i>Fast Atom Bombardment</i> Bombardeo Atómico Rápido		
<b>CE</b>	<i>Capillary Electrophoresis</i> Electroforesis Capilar	<b>FINS</b>	<i>Forensically Informative Nucleotide Sequencing</i> Secuenciación Nucleotídica con Información Forense		
<b>CEE</b>	Comunidad Económica Europea	<b>FIR</b>	Infrarrojo Lejano		
<b>cm</b>	Centímetro	<b>FRET</b>	<i>Fluorescence Resonance Energy Transfer</i> Transferencia de Energía de Resonancia Fluorescente		
<b>COI</b>	<i>Cytochrome oxidase I</i> Citocromo oxidasa I	<b>g</b>	Gramo		
<b>C<sub>p</sub></b>	<i>Crossing point</i> Punto de corte	<b>h</b>	Hora		
<b>C<sub>t</sub></b>	<i>Threshold cyle</i> Ciclo umbral	<b>HPLC</b>	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>		
<b>CV</b>	<i>Coefficient of Variation</i>				

	Cromatografía Líquida de Alta Resolución	<b>mL</b>	Mililitro
<b>HPLC-EC</b>	Cromatografía Líquida de Alta Resolución con Detección Electroquímica	<b>MS</b>	<i>Mass Spectrometry</i> Espectrometría de Masas
<b>ICH</b>	<i>International Conference on Harmonisation</i> Conferencia Internacional sobre Armonización	<b>mtDNA</b>	<i>Mitochondrial Deoxyribonucleic Acid</i>
<b>IEF</b>	Isoelectroenfoque	<b>NCBI</b>	<i>National Centre for Biotechnology Information</i>
<b>IR</b>	Infrarrojo	<b>ng</b>	Nanogramo
<b>ISO</b>	<i>International Organization for Standardization</i> Organización Internacional para la Estandarización	<b>NIR</b>	Infrarrojo Cercano
<b>IT</b>	Ionic trap Trampa iónica	<b>NIRS</b>	<i>Near Infrared Spectroscopy</i> Espectroscopia de Infrarrojo Cercano
<b>kDa</b>	Kilodalton	<b>nm</b>	Nanómetro
<b>kg</b>	Kilogramo	<b>OMG</b>	Organismo Modificado Genéticamente
<b>km</b>	Kilómetro	<b>PAGIF</b>	<i>Polyacrylamide Gel Isoelectric Focusing</i> Isoelectroenfoque en gel de poliacrilamida
<b>LC-ESI-IT</b>	Cromatografía líquida de alta resolución/fase reversa acoplada a espectrometría de masas de tipo electrospray-trampa iónica	<b>pb</b>	pares de bases
<b>m</b>	Metro	<b>PBS</b>	<i>Phosphate-Buffered Saline</i>
<b>MALDI</b>	<i>Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization</i> Desabsorción/Ionización Láser Asistida por Matriz	<b>PCR</b>	<i>Polymerase Chain Reaction</i> Reacción en Cadena de la Polimerasa
<b>MAPA</b>	Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación	<b>PCR-RAPD</b>	<i>PCR-Random Amplified Polymorphic DNA</i>  Polimorfismo del ADN Amplificado con Cebadores Arbitrarios
<b>MARM</b>	Ministerio de Medio Ambiente, y Medio Rural y Marino	<b>PCR-RFLP</b>	<i>PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism</i> Polimorfismo en la Longitud de los Fragmentos de Restricción de Regiones Amplificadas por PCR
<b>MC1R</b>	<i>Melanocortin 1 receptor</i> Receptor 1 de la Melanocortina	<b>pg</b>	picogramo
<b>mg</b>	Miligramo	<b>pmol</b>	Picomol
<b>MGB</b>	<i>Minor Groove Binder</i>	<b>RDP1</b>	<i>First intron of the Nuclear Rhodopsin Gene</i> Intrón 1 del Gen Nuclear de la Rodopsina
<b>μL</b>	Microlitro	<b>RNA</b>	<i>Ribonucleic Acid</i>
<b>min</b>	Minuto	<b>rRNA</b>	<i>Ribosomal Ribonucleic Acid</i>
<b>MIR</b>	Infrarrojo Medio	<b>RP-HPLC</b>	Cromatografía Líquida de Alta Resolución con Columnas de Fase Reversa
		<b>rpm</b>	<i>revolutions per minute</i>

<b>SBH</b>	<i>Sequencing by Hybridization</i> Secuenciación por Hibridación				Proteína Soluble en Disoluciones Salinas
<b>SD</b>	<i>Standard Deviation</i> Desviación Standar	<b>STR</b>	<i>Short Tandem Repeats</i> Repeticiones Cortas en Tándem		
<b>SDS</b>	<i>Sodium Dodecyl Sulphate</i> Dodecil Sulfato Sódico	<b>t</b>	Tonelada		
<b>SDS-CE</b>	Electroforesis Capilar con SDS	<b>T<sub>m</sub></b>	<i>Melting temperature</i> Temperatura de disociación		
<b>SDS-PAGE</b>	Electroforesis en Gel de Poliacrilamida con SDS	<b>TOF</b>	<i>Time of flight</i> Tiempo de vuelo		
<b>SNP</b>	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i> Polimorfismo de Nucleótido Simple	<b>UV</b>	<i>Ultraviolet</i>		
<b>SSP</b>	<i>Salt Soluble Protein</i>	<b>V</b>	Voltio		
		<b>WSP</b>	<i>Water Soluble Protein</i> <i>Proteína Soluble en Agua</i>		

